

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

LA HOMOCISTEÍNA COMO FACTOR DE RIESGO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Raquel Tenorio Vela
Octubre 2007

Memoria presentada por
RAQUEL TENORIO VELA
Para aspirar al Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA MOLECULAR)

Directora de esta tesis:
MARÍA JESÚS BULLIDO GÓMEZ-HERAS
Dra. en Ciencias Químicas
(Biología Molecular)

Madrid, Octubre 2007

El presente trabajo ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, gracias a una beca de formación de personal investigador financiada por la Comunidad de Madrid.

A mi familia

“Todo lo que una persona puede imaginar,
otras podrán hacerlo realidad.”

Julio Verne

Cuando vuelvo la vista atrás de estos últimos 7 años siento una sensación vertiginosa; la tesis aquí presente ha resultado ser una prueba de madurez para mí, no sólo en el ámbito científico sino también en el personal.

Ha llovido mucho desde que llegué a Madrid, y dos días después, me incorporé al que hoy es mi labo. Han sucedido muchas experiencias, unas buenas, otras no tanto, pero lo importante es que hoy puedo estar escribiendo estas palabras, aquí, en mi tesis.

El hecho de que hoy todo el esfuerzo se haya materializado en un libro, en una tesis, en un título, se le debo a mucha gente. Sería injusto decir que esta tesis es sólo mía, ya que sin el esfuerzo, el apoyo, de todas estas personas nunca se habría hecho realidad.

En primer lugar a Carlos, que ha tragado carretas y carretones, que se ha quitado de dormir para llevarme a la uni a horas intempestivas, que me ha aguantado estoicamente cuando le taladraba con los resultados de mis PCRs y de mis westerns, cuando me encontró el CD con los datos que había deslocalizado y me estaba volviendo loca, cuando me echaba una mano, un pie, un brazo o lo que hiciera falta en las traducciones, cuando me sujetaba la mano firme para darme fuerza para seguir para adelante cuando no quería saber nada del mundo...No hay gracias lo suficientemente profundas para plasmar todo lo que le debo.

A Mariví y a Marijose por vuestra amistad incondicional, por estar ahí, al pie del cañón, en los buenos momentos y en los malos. Por todo el apoyo que me habéis ofrecido... ¡gracias muchachas!

A Fernando Guzman, por aguantar estoicamente todas mis fricadas, porque siempre has estado ahí dispuesto a ayudar siempre que hiciera falta, porque siempre he encontrado una sonrisa en tu rostro. A Mamen, por tus charlas para hacerme ver las cosas, por todo el apoyo prestado desinteresadamente y... por enseñarme a cultivar (¡qué leches!). A Mary, M^aCarmen, por responder a todas mis preguntas (que eran muchas), a Loreto por nuestras charletas a media tarde. A Teresa, Soraya, Diego, Anita, Jesús, por animar el día a día del labo haciendo la rutina más llevadera. A Isabel, por todas esas PCRs de Applied que te has tragado.

Gracias a las Malenis por toda la ayuda ofrecida, por responder amablemente a todas mis preguntas y aguantar todas mis visitas pedigüeñas y a Pedro Carmona, por su inestimable ayuda bioinformática.

A mis padres, a mi hermana María José y mi sobrino Cristian que siempre han creído en mí, y siempre he contado con su apoyo a pesar de la distancia. A Amalia, por su optimismo y toda la ayuda ofrecida, que siempre le parecía poca.

A Sonia y Josep, por todos esos momentos que hemos compartido y por toda la amistad ofrecida. Al Fri, por estar ahí, al otro lado del ciberespacio, compartiendo paranoias. A Leo y Silvia, por vuestra generosidad y por toda la ayuda prestada desinteresadamente. A Paz, por tus sabios consejos, los cuales han marcado una nueva trayectoria en mi vida. A Ángela, por mostrarme que somos más libres de lo que pensamos.

A todos los parroquianos de las jornadas lúdicas y afines: Willy, Irene, Heriss, Terrax, Furgo, Angel, Raquel, Cristian, Kaede, Gil Galen, Paty, Nacho, Cristina, Javi, muchas gracias por todos esos buenos momentos, de risa y de jolgorio y no olvidéis que....¡Feliz, feliz no cumpleaños!

A mis “niñas felinas” Zarpi y Noche por hacerme compañía todas esas largas noches de escritura, por ejercer de pisapapeles de los artículos y por todo el cariño que derrocháis.

Y finalmente, a Mariaje, por enseñarme que es una tesis y el mundo científico, y porque... ¡“ante la duda, la cojonuda”!; y cómo no, a Fernando Valdivieso, por creer en mí y darme la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio.

¡¡¡¡Gracias a todos!!!!

Índice

RESUMEN/SUMMARY	21
ABREVIATURAS	27
 I. INTRODUCCIÓN	 35
1.1 LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	37
1.1.1 La enfermedad de Alzheimer familiar.....	39
1.1.2 La enfermedad de Alzheimer esporádica.....	42
1.2 HIPERHOMOCISTEINEMIA (HHCY)	44
1.2.1 Metabolismo de la homocisteína.....	45
1.2.1.1 Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).....	46
1.2.1.2 Metil sintasa reductasa (MTRR).....	47
1.2.2 Mecanismos biológicos de la neurotoxicidad de la homocisteína.....	48
1.2.2.1 Producción de estrés oxidativo.....	48
1.2.2.2 Producción de estrés de retículo.....	49
1.2.2.3 Inducción de apoptosis.....	50
1.2.2.4 Alteraciones en el sistema inmune	50
1.2.2.5 Excitotoxicidad	51
1.2.3 Efectos de la Homocisteína promotores de la patofisiología de la Enfermedad de Alzheimer esporádica.....	52
1.2.3.1 Efectos directos sobre la Enfermedad de Alzheimer.....	53
1.2.3.2 Efectos indirectos sobre la Enfermedad de Alzheimer.....	56
 II. OBJETIVOS	 59
 III. MATERIALES Y MÉTODOS	 63
3.1 MUESTRAS HUMANAS: PACIENTES Y CONTROLES.....	65

Índice

3.2 LÍNEA CELULAR Y TRATAMIENTOS.....	65
3.2.1 Línea celular.....	65
3.2.2 Tratamientos.....	65
3.2.2.1 Ausencia de folato.....	66
3.2.2.2 Homocisteína.....	67
3.2.2.3 Xantina-Xantina oxidasa.....	67
3.2.2.4 Tratamiento combinado	67
3.3 ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.....	68
3.3.1 Obtención de lisados celulares.....	68
3.3.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).....	68
3.3.3 Inmunomarcado después de electroforesis en geles de poliacrilamida.	68
3.4 ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	70
3.4.1 Estudio de la viabilidad celular mediante ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).....	70
3.4.2 Estudio de la necrosis mediante el análisis de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).....	71
3.5 ANÁLISIS DE LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS.....	72
3.5.1 Estudio de la apoptosis mediante la cuantificación de la proteólisis de PARP.....	72
3.5.2 Estudio de la apoptosis mediante citometría de flujo en presencia de yoduro de propidio	72
3.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL.....	73
3.6.1 Microarrays de ADN	73
3.6.1.1 Fundamentos de la tecnología del microarray Human Genome Survey Microarray V2.0.....	74

3.7 ESTUDIO DE ASOCIACION GENÉTICA CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	75
3.7.1 Selección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de los genes candidatos.....	75
3.7.2 Genotipificación con sondas FRET.....	76
3.7.2.1 Fundamentos sobre el funcionamiento de las sondas FRET.....	76
3.7.2.2 Genotipificación de los polimorfismos C667T y A1298G del gen MTHFR.....	78
3.7.3 Genotipificación con sondas TaqMan-MGB	80
3.7.3.1 Fundamentos sobre el funcionamiento de las sondas.....	80
3.7.3.2 Genotipificación del polimorfismo A66G del gen MTRR.....	82
IV. RESULTADOS	85
4.1 EFECTO DE LA HOMOCISTEÍNA A CONCENTRACIONES FISIOLÓGICAS Y DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA MODERADA EN UN MODELO NEURONAL HUMANO.....	87
4.1.1 Estudio de la viabilidad celular	87
4.1.1.1 Estudio de la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT.....	87
4.1.1.2 Estudio de la viabilidad celular mediante la liberación de LDH.....	88
4.1.2 Medida de la inducción de apoptosis.....	91
4.1.2.1 Estudio de la inducción de apoptosis mediante la proteólisis de PARP	91
4.1.2.2 Estudio de la inducción de apoptosis mediante la determinación de la fragmentación del ADN.....	92

4.2 EFECTO DE LA HOMOCISTEÍNA A CONCENTRACIONES FISIOLÓGICAS Y DE HIPERHOMOCISTEINEMIA MODERADA EN PRESENCIA DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	94
4.2.1 Estudio de la viabilidad celular en presencia de EO.....	95
4.2.1.1 Estudio de la viabilidad celular mediante la liberación de LDH	95
4.2.2 Medida de la inducción de apoptosis.....	97
4.2.2.1 Estudio de la inducción de apoptosis por efecto de la Hcy en presencia de EO mediante la proteólisis de PARP	97
4.2.2.2 Estudio de la inducción de apoptosis por efecto de la Hcy en presencia de EO mediante la fragmentación del ADN.....	100
4.3 EFECTO DE LA AUSENCIA DE FOLATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA HIPERHOMOCSTEINEMIA MODERADA EN AUSENCIA Y EN PRESENCIA DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	102
4.3.1 Estudio de la muerte por apoptosis bajo la ausencia de folato, en ausencia y en presencia de EO.....	102
4.3.1.1. Estudio de la muerte por apoptosis mediante la proteólisis de PARP.....	102
4.3.1.2 Estudio de la muerte por apoptosis mediante la fragmentación del ADN	104
4.4 ESTUDIO GENÓMICO DE LOS EFECTOS DE LA HOMOCISTEÍNA EN CÉLULAS NEURONALES HUMANAS EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	107
4.4.1. Estudio de la expresión génica diferencial mediante microarrays de ADN.....	107

4.4.1.1 Estudio de la expresión génica inducida por la hiperhomocisteinemia moderada.....	108
4.4.1.2 Estudio de la expresión génica inducida por la hiperhomocisteinemia moderada en presencia de estrés oxidativo	112
4.4.2 Análisis funcional de los genes sobreexpresados y reprimidos con la hiperhomocisteinemia moderada en ausencia y presencia de estrés oxidativo.....	117
4.4.2.1 Análisis funcional mediante Panther®.....	117
4.4.2.2 Análisis funcional mediante Genecodis.....	123
4.4.2.3 Análisis funcional mediante GSEA.....	129
4.5 ASOCIACIÓN DE GENES RELEVANTES DEL CICLO DEL FOLATO CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	134
4.5.1 Estudio de asociación caso-control.....	134
4.5.2 Estudio de asociación del polimorfismo C677T estratificando por factores genéticos.....	135
4.5.2.1 Estudio haplotípico de los polimorfismos C677T y A1298C de la MTHFR	138
4.5.3 Estudio de asociación del polimorfismo C677T estratificando por factores no genéticos.....	139
V. DISCUSIÓN	143
5.1 EFECTO DE LA HOMOCISTEÍNA EN LA VIABILIDAD Y LA MUERTE APOPTÓTICA DE LAS CÉLULAS SK-N-MC.....	145

5.2 EFECTO DE LA HOMOCISTEÍNA EN LA VIABILIDAD Y LA MUERTE APOPTÓTICA EN PRESENCIA DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	147
5.3 EFECTO DE LA AUSENCIA DE FOLATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA MODERADA EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	149
5.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL INDUCIDA POR LA HIPERHOMOCISTEINEMIA MODERADA EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	150
5.5 ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES MODULADOS POR LA HIPERHOMOCISTEINEMIA MODERADA EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	152
5.6 ASOCIACIÓN DE GENES RELEVANTES DEL CICLO DEL FOLATO CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	156
VI. CONCLUSIONES	161
VII. BIBLIOGRAFÍA	167

Summary

Homocysteine (Hcy) is an intermediate sulfur-containing amino acid which acts as a methyl group donor for methionine metabolism in the folate cycle. Elevated plasma homocysteine concentration (hyperhomocysteinemia, HHcy) has been associated with an increased risk of developing several diseases, such as Alzheimer's disease (AD), through its effects on apoptotic cell death, oxidative stress (EO), endoplasmic reticulum stress, excitotoxicity, and alteration of the immune system. Therefore, we proposed to study the effects of HHcy in a human neuronal model in absence or presence of EO, as occurs in the aging process.

The results obtained from the "in vitro" model revealed that Hcy from physiological concentrations (10 μ M) up to mild HHcy (100 μ M of Hcy) is a protective factor, increasing cellular viability and reducing apoptotic cell death, specially under the presence of EO, and under the correct folate levels. However, in the absence of folate, mild HHcy became neurotoxic, increasing the cell toxicity caused by EO.

To get an insight into the mechanism involved in the protective effect of mild HHcy, we made a differential expression study of the "in vitro" model. We could observe that HHcy by itself regulated the pathways involved in defense and immunity and activated pathways related to neuronal survival, like the neurogenesis process. On the other hand, mild HHcy in the presence of EO also regulated the immune response, activated the transport paths necessary for increasing the energetic supply to the cell and it repressed all the pathways related to excitotoxicity, strengthening its neuroprotector role.

Finally, we performed a genetic association study for the main genes responsible of regulating Hcy levels: MTHFR and MTRR, which play a key role in folate cycle. From this study we observed that allele C from the polymorphism C677T of MTHFR was associated with increased AD risk. Furthermore, the risk was higher in the individuals homozygous for the A allele of the MTHFR polymorphism A1298C, in the carriers of ApoE4 allele and in

males. Consequently the MTHFR 677T allele, which codifies for a thermolabile isoform of the protein, and is associated with mild HHcy, confers protection against AD. This observation suggests, in nice agreement with the results of the “in vitro” studies, that mild HHcy could protect against AD associated neurodegeneration.

Abreviaturas

Abreviaturas

12-LOX.....	12- Lipooxigenasa
ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
AIF.....	Factor inductor de apoptosis
Ala.....	Alanina
APOC1.....	Gen de la apolipoproteína C1
APOE	Gen de la apolipoproteína E
ApoE.....	Apolipoproteína E
APP.....	Proteína precursora del péptido β -amiloide
ARN.....	Ácido ribonucleico
Asp.....	Ácido aspártico
ATP.....	Adenosil trifosfato
A β	Péptido β -amiloide
BACE	Enzima de corte de la APP por la región beta
BHMT.....	Betaína-homocisteína metiltransferasa
BSA.....	Seroalbúmina bovina
C.I.	Intervalo de confianza
CBS.....	Cistationina-beta sintasa
cDNA.....	ADN complementario
COX.....	Enzima citocromo C oxidasa
CST3.....	Cistatina 3
Cys.....	Cisteína
D.O.	Densidad óptica
EA.....	Enfermedad de Alzheimer
ECL.....	Reactivo quimioluminiscente intensificado
EO.....	Estrés oxidativo
ERE.....	Estrés del retículo endoplásmico
ESR1.....	Receptor de estrógeno 1
FRET.....	Transferencia de energía de resonancia fluorescente
GABA.....	Ácido gamma-aminobutírico

Abreviaturas

GADD153.....	Isoforma 153 del gen inductor de daño al DNA y parada del ciclo
Glu.....	Ácido glutámico
GO.....	Ontología Génica
GPx.....	Glutation peroxidasa
grp78.....	Proteína regulada por glucosa de 78KDa
grp94.....	Proteína regulada por glucosa de 94KDa
GSEA.....	Análisis de enriquecimiento de sets genéticos
GSH.....	Glutation
Hcy.....	Homocisteína
HERP.....	Proteína residente en retículo endoplásmico de respuesta a homocisteína
HHcy.....	Hiperhomocisteinemia
HLA-DPA1.....	Complejo mayor de histocompatibilidad , clase II, DP alfa 1
HLA-DRB4.....	Complejo mayor de histocompatibilidad , clase II, DR beta 4
HMGCR.....	3-hidroxy-3-metilglutaril coenzima A reductasa
HMOX1.....	Hemoxigenasa 1
IL17RB.....	Receptor B de interleukina 17
IL1B.....	Interleukina 1 beta
IL6.....	Interleukina 6
IL8.....	Interleukina 8
Ile.....	leucina
IP3.....	inositol trifosfato
IRF4.....	Factor 4 regulador de interferón
KDa.....	Kilodalton
LDH.....	Lactato deshidrogenasa
MCP1.....	Proteína quimiotáctica del monocito 1
MEM	Medio mínimo esencial
Met	Metionina
MGB	Unión al surco menor
mGluR.....	Receptores metabotrópicos de glutamato

Abreviaturas

MTHFR.....	Metilentrehidrofolato reductasa
MTR.....	Metionina sintasa
MTRR.....	Metionina sintasa reductasa
MTT.....	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NCSTN.....	Nicastrina
NFκB.....	Factor nuclear kappa-B
NMDAr.....	Receptores del N-metil-D-Aspartato
NO.....	Óxido Nítrico
NTC.....	Controles negativos de la PCR
O.R.....	Riesgo relativo (Odds ratio)
PARP.....	Poli (ADP-ribosa) polimerasa
PBS.....	Tampón fosfato salino
PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa
PSEN1.....	Gen de la presenilina -1
psen1	Presenilina-1
PSEN2.....	Gen de la presenilina -2
psen2	Presenilina-2
RE.....	Retículo endoplasmático
ROS.....	Especies reactivas de oxígeno
SAH.....	S-adenosil homocisteína
SAM.....	S-adenosil metionina
SDS.....	Sulfato sódico de dodecilo
SLC2A2.....	Miembro 2 de la familia de transportadores de solutos
SNP.....	Polimorfismo de un único nucleótido
SOD	Superóxido dismutasa
Tend.	Tendencia
TF	Transferrina
Tm	Temperatura de fusión
TNF.....	Factor de necrosis tumoral

Abreviaturas

TNFRSF1B.....	Miembro 1B, de la superfamilia de recetores del TNF
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
u.a.....	Unidades arbitrarias
Val.....	Valina
VRC.....	Veces respecto al control
vs.....	Versus
Xox.....	Xantina + xantina oxidasa

Introducción

1.1 LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un proceso neurodegenerativo cuya prevalencia aumenta con la edad; afecta aproximadamente al 5% de las personas mayores de 65 años y hasta el 30-40% de las mayores de 85 años, representando la forma más común de demencia en la tercera edad. Se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria y de otras funciones cognitivas que conducen finalmente a la demencia [Katzman et al, 1986; Ferry et al, 1994]

Entre las características neuropatológicas de la enfermedad, en los cerebros de los enfermos con EA se observa una elevada muerte neuronal, alteraciones de varios sistemas neurotransmisores, depósitos proteicos extracelulares denominados placas amiloides, degeneraciones intraneuronales también denominadas ovillos neurofibrilares, angiopatía amiloide, degeneración granulovacuolar y cuerpos de Hirano [Small et al, 2006]

Las placas amiloides (figura I-1), que se utilizan para el diagnóstico de la enfermedad post mortem, son unos precipitados proteicos constituidos principalmente por una zona central de amiloide, que normalmente se encuentra rodeada de neuritas distróficas (terminaciones neuronales degeneradas, tanto axonales como dendríticas) y algunas células gliales como astrocitos y microglía activada. Existen también depósitos amiloides que carecen de los componentes mencionados (neuritas distróficas y células gliales) y reciben el nombre de placas difusas. El componente central de las placas es el péptido hidrofóbico de 39 a 43 aminoácidos, si bien las formas mayoritarias son las de 40 y 42 aminoácidos, denominado β -amiloide ($A\beta$), el cual procede de una proteína transmembrana de tipo I llamada proteína precursora del péptido β -amiloide (APP). Aunque se desconocen los mecanismos que contribuyen al proceso de formación de las placas amiloides, aunque se cree que aparece en primer lugar la placa difusa, la cual daría lugar a la placa madura amiloide [Yamaguchi et al, 1994; Pugliese et al, 2007]

Introducción

Las degeneraciones intraneuronales están formadas por un acúmulo de fibrillas en el citoplasma neuronal que acaba dando lugar a la formación de los ovillos neurofibrilares. Estos ovillos están formados por parejas de filamentos cruzados helicoidalmente, cuyo componente principal es la proteína asociada a microtúbulos tau. La proteína tau, la cual tiene función estabilizadora de los microtúbulos, aparece en los ovillos altamente fosforilada, insoluble y difícilmente degradable. Los ovillos neurofibrilares se presentan principalmente en las neuronas piramidales del hipocampo, corteza entorrinal y parahipocampal, núcleos del tronco, y en fases más avanzadas de la enfermedad, en diversas zonas del neocórtex [Corder et al, 2000]. (Figura I-1)

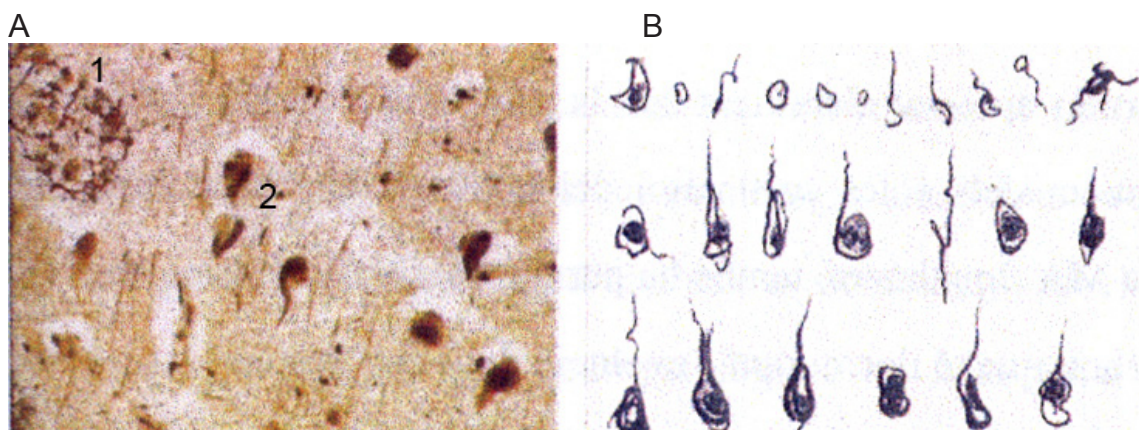


Figura I-1: A) Placa amiloide (1) y ovillos neurofibrilares (2).
B) Degeneración neurofibrilar (dibujo original de A. Alzheimer).

La angiopatía amiloide, también conocida como angiopatía congófila, se produce por el depósito amiloide en las paredes de los vasos leptomeníngeos (principalmente en la capa adventicia y mediana de las arterias de pequeño y medio calibre) y de los capilares de la corteza cerebral [Castellani et al, 2004]. La degeneración granulovacuolar es la presencia de vacuolas vacías que aparecen mayoritariamente en los cuerpos celulares de las células piramidales del hipocampo. Por último, los cuerpos de Hirano son agregaciones de estructuras en forma de espina que también se encuentran en las neuronas piramidales del hipocampo y parecen estar formadas por los diversos elementos del citoesqueleto y otras proteínas asociadas con los microfilamentos [Lee et al, 2006].

Desde el punto de vista clínico, la EA se ha clasificado en función de la edad de aparición de los síntomas y de la forma de herencia. En cuanto a la edad se distingue entre formas preseniles que se manifiestan antes de los 60 años, y las formas seniles, con edad de aparición de los síntomas posterior a los 60-65 años. En cuanto a la forma de herencia, la EA monogénica o familiar se transmite de forma autosómica dominante, respondiendo a una forma de herencia monogénica (tal como su nombre indica) y la esporádica es una enfermedad compleja o multifactorial, en la que confluyen factores genéticos y ambientales.

1.1.1 La enfermedad de Alzheimer familiar

Aproximadamente un 2% del total de casos de EA corresponden al tipo monogénica y son producidos por mutaciones en estos tres genes: APP [Goate et al, 1991], presenilina-1 (PSEN1) [Sherrington et al, 1995] y presenilina-2 (PSEN2) [Levy-Lahad et al, 1995; Rogaev et al, 1995].

Como se ha mencionado anteriormente, APP es la proteína precursora de A β cuya producción y agregación se considera un evento central en la patología molecular de la EA. APP es una glicoproteína transmembrana [Mattson et al, 1997], que se sintetiza en el retículo endoplasmático, desde donde viaja, vía aparato de Golgi y vesículas secretoras, a la membrana plasmática. Su ARN mensajero da lugar, por procesamiento alternativo, a isoformas de 695 a 770 aminoácidos. La primera mutación encontrada en el gen de APP provocaba un cambio de valina a isoleucina en la posición 717 (de la isoforma de 770 aminoácidos), cerca de la región carboxi-terminal de la proteína. Hasta hoy se han descrito 25 mutaciones en este gen que causan la forma presenil de EA (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>). Estas mutaciones no se reparten uniformemente a lo largo de la proteína sino que se concentran en regiones críticas del procesamiento proteolítico de la APP.

Introducción

La APP puede sufrir dos tipos de procesamiento proteolítico: no amiloidogénico y amiloidogénico [Sisodia et al, 1990]. En las vesículas secretoras o en la propia membrana, algunas moléculas de APP sufren un corte proteolítico por las proteasas α -secretasa, β -secretasa o γ -secretasa. Según cuál de estas proteasas actúe se puede dar el procesamiento amiloidogénico o no [Octave et al, 1995]. El procesamiento no amiloidogénico se produce cuando actúa la α -secretasa, entre los residuos Lys687 y Leu688 (de la isoforma de la APP 770), que corresponden a los residuos 16 y 17 del péptido A β , respectivamente. Eso provoca la liberación del extremo extracelular amino-terminal, el cual es soluble y recibe el nombre de sAPP α , quedando otro fragmento menor, que queda interno en la membrana, llamado C83. Este fragmento es endocitado y procesado posteriormente por la γ -secretasa que podrá cortar en las posiciones 712, 714 o 715 de la APP. Así la acción consecutiva de la α y la γ -secretasa no permite que se forme el péptido A β entero. Sin embargo, en el procesamiento amiloidogénico, la APP de la membrana es internalizada por vesículas recubiertas de clatrina, y en el procesamiento vía endosomas-lisosomas, en lugar de actuar la α -secretasa, actúa la β -secretasa cortando la APP entre los residuos Met671 y Asp672, liberando una fracción amino-terminal llamada sAPP β y dejando un fragmento en la membrana (llamado C99) que será el sustrato para la γ -secretasa [Kowalska et al, 2004]. El procesamiento por parte de la γ -secretasa es el mismo que el producido en el procesamiento no amiloidogénico, generándose 3 posibles péptidos de 40, 42 o 43 aminoácidos, atendiendo al residuo de corte de la γ -secretasa. Estos péptidos son las diferentes formas de A β [Small et al, 1998] (Figura I-2).

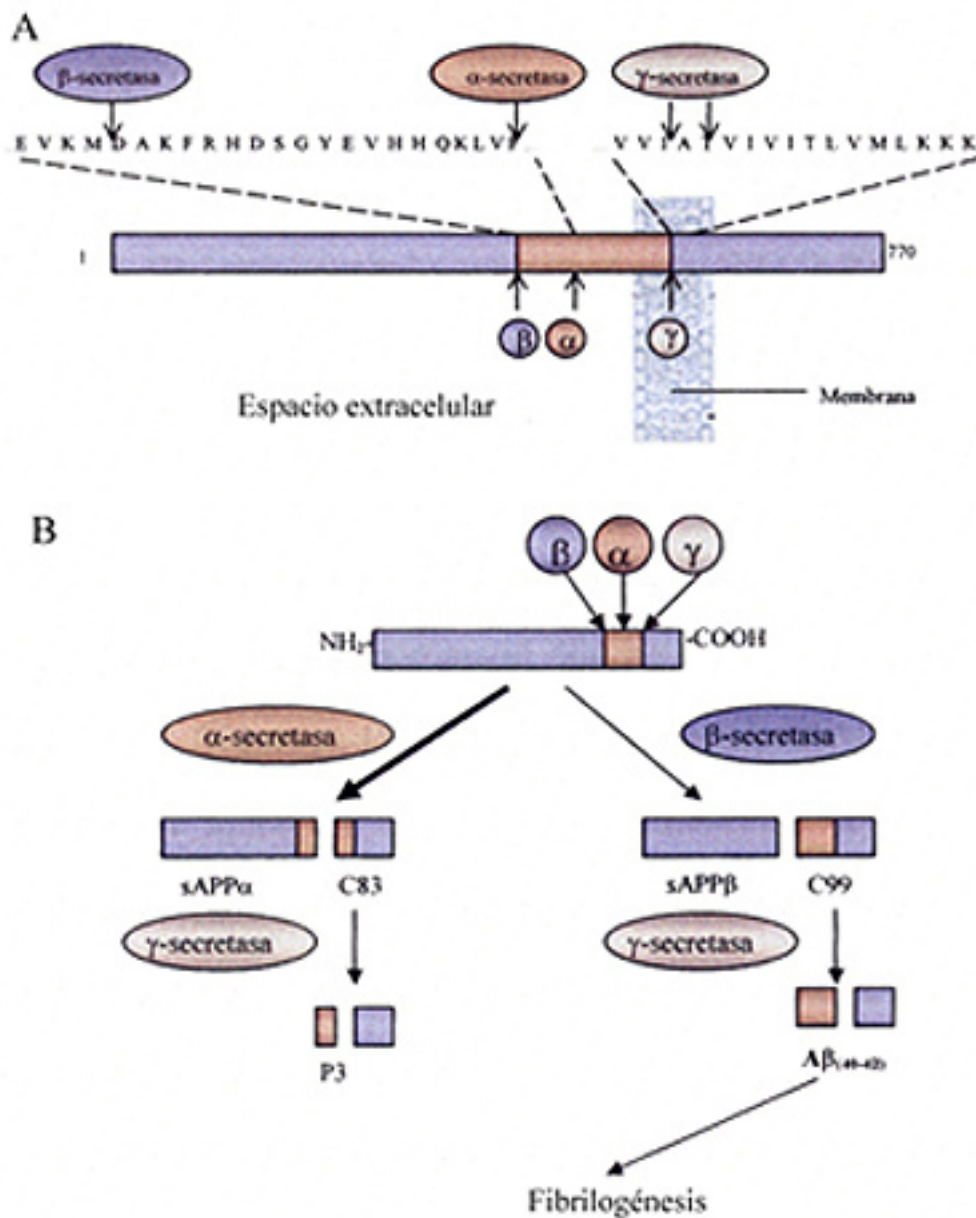


Figura I-2: A) Representación esquemática de la APP. La secuencia aminoacídica del péptido A β está representada en la parte superior, indicando las localizaciones concretas del procesamiento del péptido por las diversas secretasas. B) Procesamiento de la APP. En la vía no amiloidogénica participan la α y la γ -secretasas. En la vía amiloidogénica actúan la β y la γ -secretasa, formando el péptido A β .

Las presenilinas (PSEN1 y PSEN2, gen; psen1 y psen2, proteína) se localizan en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi y muestran una organización topográfica similar, siendo proteínas de ocho fragmentos transmembrana [Mattson et al, 1998].

Se suman ya más de 150 mutaciones en la PSEN1 y aproximadamente 10 mutaciones en la PSEN2 vinculadas a la EA monogénica. Estas mutaciones, provocan un aumento de la proporción entre los péptidos AB42/AB40. Su implicación en la EA se atribuye a que las presenilinas conforman el componente catalítico de la γ -secretasa [Li et al, 2000; Ester et al, 2000; Vetrivel et al, 2006; De Strooper et al, 2007], por lo que las presenilinas actúan en el procesamiento endosomal-lisosomal de la APP, participando de forma directa en la generación de A β en el interior de la célula [Struhl et al, 1999; De Strooper et al, 1999; Wolfe et al, 1999]. Las presenilinas son necesarias, además, para el desarrollo del sistema nervioso, actuando sobre la vía de Notch que está relacionada con la supervivencia neuronal [Yu et al, 2001; Sisodia et al, 2002; Selkoe et al, 2003]

1.1.2 La enfermedad de Alzheimer esporádica

La gran mayoría de los casos de EA son de aparición tardía y consecuencia de una enfermedad compleja o multifactorial. El desarrollo de la enfermedad viene determinado por la combinación de genes de susceptibilidad y factores ambientales, siendo los principales factores de riesgo la edad avanzada y la existencia de antecedentes familiares. A pesar de la complejidad de dilucidar los genes y factores que están implicados en la etiopatología de EA, disponemos hoy en día, de una larga lista de candidatos. Entre ellos, la apolipoproteína E (APOE, gen; ApoE, proteína) es el más consolidado.

El alelo E4 del gen de ApoE es el principal factor de riesgo asociado a EA [Strittmatter et al, 1993; Corder et al, 1993]. No obstante, se han citado más de

un centenar de genes candidatos con sus respectivos polimorfismos, recogidos en la página web www.alzgene.org [Bertram et al, 2004b; Bertram et al, 2007], donde se ha realizado un exhaustivo meta-análisis de todos los experimentos de asociación realizados hasta la fecha. De dicha página, obtenemos la lista de los genes que están más significativamente vinculados a la EA. Los genes vinculados a mayor riesgo son, además de APOE: el gen de la apolipoproteína C1 (APOC1), cistatina 3 (CST3), receptor de estrógeno 1 (ESR1), nicastrina (NCSTN), transferrina (TF) y el del factor de necrosis tumoral (TNF). Según este meta-análisis, encontramos que el gen de la MTHFR (más concretamente el polimorfismo A1298T) también se ha vinculado a la EA, señalando el posible papel del ciclo del folato en la etiología de la enfermedad.

Además de los genes candidatos como tal, se han señalado otros loci ligados a la EA [Hardy et al, 1998; Selkoe et al, 1999; Kehoe et al, 1999; Bertram et al 2004a], lo cual ilustra la complejidad del mecanismo que subyace a la EA.

También se han estudiados factores ambientales, que pueden tener un papel relevante en la EA por sí mismos o modulando el efecto de los genes. Entre ellos, la edad avanzada es el factor más claro, seguido del sexo femenino, los antecedentes familiares de EA, sufrir síndrome de Down o tener familiares de primer grado que lo padezcan [Schupf et al, 2001], la existencia de traumatismo craneal severo [Molgaard et al, 1990], la deficiencia de vitaminas del grupo B en sangre [Luchsinger et al, 2004], la hipertensión arterial crónica, la diabetes [Skoog et al, 1996; Ott et al, 1996], las infecciones virales [Itzhaki et al, 1997] o la hiperhomocisteinemia [Teunissen et al, 2002; Gallucci et al, 2004].

La complejidad desplegada por las posibles interacciones genéticas y ambientales hace que sea muy difícil desentrañar las bases moleculares de la enfermedad, no obstante, cada pequeña aportación en el aparente caos de esta enfermedad es una pieza más para completar el “puzzle” de la EA.

1.2 HIPERHOMOCISTEINEMIA

La homocisteína (Hcy) es un aminoácido no proteico que contiene un grupo tiol. Este aminoácido es el principal precursor del aminoácido esencial metionina (Met) cuyo papel en el ciclo del folato y la ruta metabólica de 1-carbono es clave, ya que es el eje de las rutas de biosíntesis de los ácidos nucleicos, proteínas, los neurotransmisores noradrenalina y serotonina [Almeida et al, 2005], así como de la metilación del ADN, proteínas, etc [Scarpa et al, 2006].

El nivel fisiológico de Hcy en sangre oscila entre 5 y 15 μ M, el rango comprendido entre 16 y 100 μ M corresponde a una hiperhomocisteinemia moderada y más de 100 μ M a una hiperhomocisteinemia severa. La concentración de homocisteína en sangre varía, dentro de los márgenes de la normalidad, según el sexo y la edad de la población analizada [Wilcken et al, 1979; Refsum et al, 1996]. No obstante, hay otra serie de factores que aumentan el nivel de Hcy de forma patológica como la administración de medicamentos como la L-dopa [Irizarry et al, 2005; Huang et al, 2005] o los anticonvulsivantes [Diaz-Arrastia et al, 2000], el déficit de estrógenos, la insuficiencia renal [Hultberg et al, 1991] o la cafeína, siendo el más importante el déficit de las vitaminas B9 (folato), B12 y B6 [Leblhuber et al, 2000; Bernasconi et al, 2006]. También se han descrito mutaciones y polimorfismos genéticos que producen una hiperhomocisteinemia (HHcy) congénita moderada como en el caso de los polimorfismos en el gen MTHFR [Religa et al, 2003] o los de la metionina sintasa reductasa (MTRR) [Gaughan et al, 2001]; o una HHcy severa por la ausencia de la enzima cistationina-beta sintasa (CBS) [Skovby et al, 1984]

La HHcy se ha relacionado con diversas enfermedades, entre ellas las más destacadas son las enfermedades cardiovasculares (en su papel aterogénico y protrombótico) [Mudd et al, 1985; Rolland et al, 1995; Mujumdar et al 2002], la diabetes tipo II [Rudy et al, 2005], daños en el hígado alcohólico [Ji et al, 2004], la osteoporosis [Koh et al, 2006], defectos en el tubo neural [Steegers-Theunissen et al, 1995; Mills et al, 1995], demencia vascular [Nilsson et al,

2002; Folin et al, 2005] y la EA [millar et al, 2003; Nilsson et al, 2004; Ellinson et al, 2004]. Sin embargo, también se ha visto que la Homocisteína puede tener un papel protector gracias a sus propiedades antiangiogénicas y antitumorales [Martinez-Poveda et al, 2003; Chavarria et al, 2003] sobre todo cuando la HHcy se contrarresta con un aporte adecuado de vitaminas B12, B6 y folato [Clarke et al, 2007], llegando incluso a observarse un efecto protector de la Hcy frente la EA, cuando los niveles de Hcy no son muy altos [Annerbo et al, 2005].

1.2.1 Metabolismo de la homocisteína

El metabolismo de la Hcy sigue dos posibles vías: la transulfuración y la remetilación (Figura I-3). Aproximadamente el 50% de la Hcy se combina en forma irreversible con la serina y genera cisteína (Cys) y glutathion (GSH) a través de la vía de transulfuración, en la que interviene la enzima CBS y su cofactor la vitamina B6. La Hcy también puede seguir la vía de la remetilación regenerando Met a través de dos mecanismos. Uno de ellos requiere la presencia de las enzimas MTHFR y metionina sintasa (MTR) además de vitamina B12 y metiltetrahidrofolato, cofactor y cosustrato respectivamente de la MTR. En este mecanismo es fundamental el folato ya que es el precursor del cofactor metiltetrahidrofolato antes mencionado. En el otro mecanismo, la remetilación es catalizada por la enzima betaína-homocisteína metiltransferasa (BHMT), en la cual el metabolito donador del grupo metilo es la betaína [Olthof et al, 2005; Ou et al, 2007].

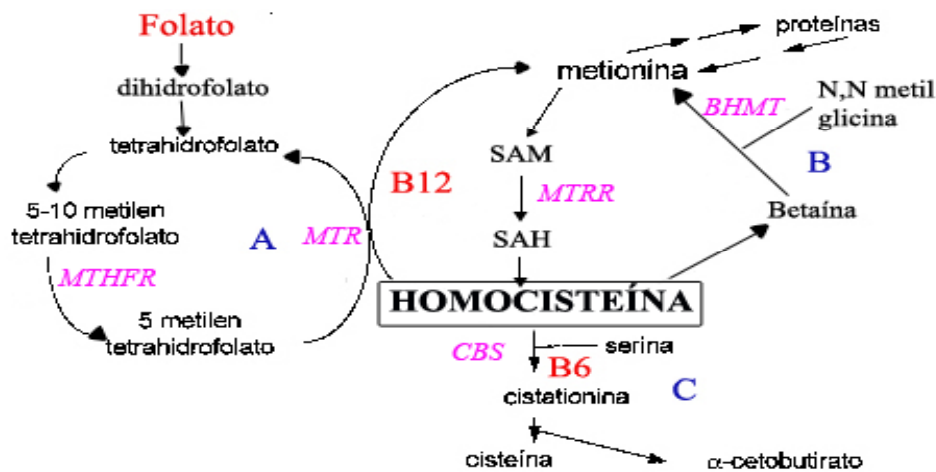


Figura I-3: Esquema del metabolismo de la homocisteína. Las rutas de remetilación están marcadas por las letras A (ciclo del folato) y B (vía de la betaína); la ruta de las transulfuración esta marcada con la letra C. En rojo están las vitaminas implicadas en el ciclo y en violeta cursiva los enzimas que intervienen.

En el cerebro, la ruta de remetilación de la betaína no actúa [McKeever et al, 1991] y la existencia de transulfuración es discutida [Finkelstein et al, 1998; Vitvitsky et al, 2006], quedando como único mecanismo de metabolización de la Hcy en las neuronas la remetilación por la ruta del ciclo de folato. Por ello, el cerebro es un órgano particularmente vulnerable a los niveles altos de Hcy en sangre.

1.2.1.1 Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

La enzima MTHFR cataliza el paso del 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato en la ruta de la remetilación. Esta enzima clave del ciclo del folato ha sido extensamente estudiada por su posible vinculación tanto con la HHcy como con la EA; se han descrito varios polimorfismos de un único nucleótido (SNP) asociados con patologías siendo C677T y A1298C los más relevantes. El primero consiste un cambio de C→T en el nucleótido 677 del gen, lo cual conlleva un cambio de aminoácido Ala→Val en el residuo 222 de la proteína. Mientras que el segundo SNP consiste en un cambio de A→C en el nucleótido

proteína, mientras que el segundo SNP consiste en un cambio de A→C en el nucleótido 1298 de gen, correspondiendo al cambio proteico Glu429Ala. Se han estudiado también polimorfismos en la región reguladora del gen de la MTHFR [Wakutani et al, 2004b]

El cambio C→T en el nucleótido 677 de la MTHFR produce una versión termolábil de la enzima, de menor funcionalidad, que, junto con el polimorfismo A1298C, provoca un aumento moderado de los niveles de Hcy en sangre [Anello et al, 2004] y se le ha asociado con un mayor riesgo para la EA [Wang et al, 2005]. Sin embargo, la relación de los polimorfismos de la MTHFR con la HHcy y con la EA ha suscitado mucha controversia [Brunelli et al, 2001; Ravaglia et al, 2004; Zhang et al, 2005; Fernandez, 2005]. Incluso se le ha llegado a asignar un papel protector contra la EA al haplotipo de la MTHFR 677C – 1298C -1793G [Wakutani et al, 2004a]. Todo ello sugiere que la variabilidad en las poblaciones estudiadas influye mucho en el efecto de la MTHFR y la HHcy sobre la EA.

1.2.1.2. Metil Sintasa Reductasa (MTRR)

La MTRR es otra de las enzimas clave del ciclo del folato. Su función consiste en regenerar la MTR, que queda inactiva tras la remetilación de Met a partir de Hcy. Para ello, la MTRR realiza una metilación reductora en la cual la S-adenosil metionina (SAM) es el donador del grupo metilo produciéndose a su vez S-adenosil homocisteína (SAH) (Figura I-4).

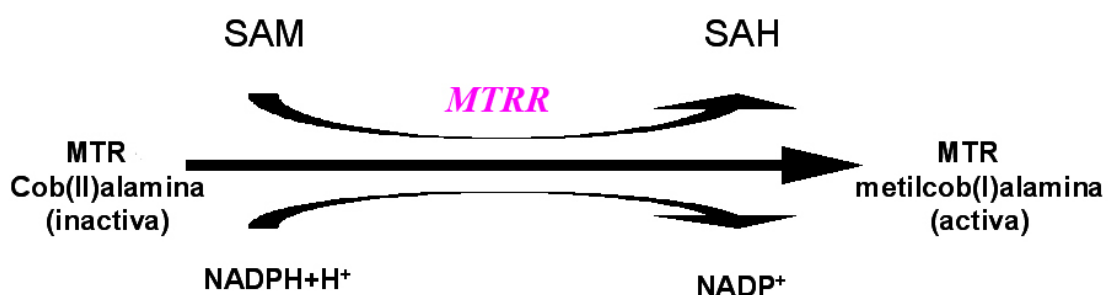


Figura I-4: Detalle de la reacción catalizada por la MTRR.

Introducción

Esta reacción es muy importante ya que su cosustrato, SAM, es requerido para más de 100 reacciones de transmetilación conocidas, incluyendo la metilación del ADN, proteínas, fosfolípidos, mielina, colina y catecolaminas [Lu et al, 2000]. Así mismo, SAH es un potente inhibidor de las metil transferasas [Kennedy et al, 2004]. Por lo tanto, un mal funcionamiento de esta enzima puede provocar serios problemas metabólicos.

Se han descrito varios SNPs en la MTRR, siendo el cambio A->G en el nucleótido 66 del gen, causante del cambio de aminoácido Ile->Met en el residuo 22 de la proteína, uno de los principales.

1.2.2 Mecanismos biológicos de la neurotoxicidad de la homocisteína

Se han descrito en la literatura varios mecanismos mediante los cuales la Hcy produce neurotoxicidad. Los principales son: producción de estrés oxidativo, producción de estrés del retículo endoplásmico, inducción de apoptosis, alteraciones en el sistema inmune y excitotoxicidad [Maler et al, 2003].

1.2.2.1 Producción de estrés oxidativo

La oxidación del grupo tiol de la Hcy se ha vinculado a la producción del anión superóxido y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [Wall et al, 1980; Siow et al, 2006] siendo esta producción de H_2O_2 mucho mayor en situaciones de deficiencia de folato. El aumento del estrés oxidativo por Hcy llega incluso a activar a la hemoxigenasa 1 (HMOX1) [Foncea et al, 2000; Sawle et al, 2001] y al factor nuclear kappa-B (NFkB) el cual es crucial en el control de las especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante apoptosis [Chern et al, 2001] además de estar implicado en la activación de sistema inmune [Schroecksnadel et al, 2004]

Por otro lado, se ha descrito a la Hcy como un potenciador del estrés oxidativo producido por el Cu^{2+} , llegando también a activar la apoptosis por esa vía [Knott et al, 2003] o provocando neurodegeneración al sumarse a la toxicidad de $\text{A}\beta$ [White et al, 2001]. Otra hipótesis apunta que la Hcy compromete la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) y disminuye la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) [Upchurch et al, 1997a; Weiss et al, 2001; Jara-Prado et al, 2003]

También la Hcy reduce la capacidad antioxidante de los tejidos, tanto reduciendo la biodisponibilidad de las vitaminas A, C y E [Huang et al, 2002], como inhibiendo la función antioxidante de las metaloproteasas [Barbato et al, 2007]. Además inhibe la expresión de proteínas propiamente antioxidantes: catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y GPx [Kumar et al, 2006; SPNG et al, 2002] reduciendo el papel protector de estos antioxidantes ante el estrés oxidativo causado por la Hcy [Racek et al, 2005]. Sin embargo, se ha demostrado in vitro que se previene la generación de H_2O_2 con el NO (por la nitrosación de la Hcy) [Upchurch et al, 1997b] así como por parte del ácido lipoico RS- α [Lockhart et al, 2000] y por la melatonina, que incrementa la expresión de la GPx [Baydas et al, 2003].

1.2.2.2 Producción de estrés de retículo

La Hcy aumenta la respuesta de retículo endoplasmático (RE) al estrés [Sharma et al, 2006], aumentando la expresión tanto de las chaperonas: la proteína regulada por glucosa de 78KDa (grp78), la proteína regulada por glucosa de 94KDa (grp94) y la isoforma 153 del gen inductor de daño al DNA y parada del ciclo (GADD153) como de otras proteínas de respuesta a este estrés como la proteína residente en el retículo endoplasmático de respuesta a homocisteína (HERP) [Outinen et al, 1998; Kokame et al, 2000]

Introducción

1.2.2.3 Inducción de apoptosis

La apoptosis es una forma de muerte celular en la que la célula se encoge, la cromatina se condensa y la acaba siendo fagocitada sin respuesta inflamatoria presente. La Hcy promueve la apoptosis a través a la rotura del ADN debido a una inadecuada metilación [Mattson et al, 2003; Sachdev et al, 2005] e, in vitro, las células, en el intento de reparar ese daño en el ADN, agotan sus reservas de ATP y se activa la vía de las caspasas [Kruman et al, 2000; LeBlanc et al, 2005] Parece ser que la Hcy activa las vías apoptóticas de la Poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) y p53 [Pak et al, 2003]. El estrés oxidativo producido por la Hcy también deriva en apoptosis mediante la activación de NFκB (como se comento más arriba). Esto produce un aumento del Ca²⁺ citosólico que daña la mitocondria, que ya está sobrecargada de por si en el intento de recuperar el ATP, liberándose el citocromo c, y por ende, activando la vía apoptótica de la caspasa 3 [Huang et al, 2001]. De la misma manera, el estrés de retículo producido por la Hcy también contribuye empeorando la situación y promoviendo la apoptosis.

No obstante, también se ha descrito que la Hcy puede conducir a otro tipo de muerte como necrosis [Kruman et al, 2000] o una mezcla de necrosis y apoptosis por efecto de la SAM [Zhao et al, 2002]; o incluso, que la Hcy a bajas concentraciones, lejos de provocar apoptosis, aumenta la proliferación celular [Buemi et al, 2001].

1.2.2.4 Alteraciones en el sistema inmune

Se ha encontrado que la Hcy estimula la producción de la interleukina 1 beta (IL1B), la interleukina 6 (IL6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) por parte de los monocitos, lo que propicia una reacción inflamatoria [Dalal et al, 2003]. Así mismo también, se ha observado que la Hcy media la expresión y la secreción, en monocitos, de la proteína quimiotáctica del monocito 1 (MCP1) y de la interleukina 8 (IL8) produciendo una reacción

proinflamatoria que puede ser revertida con una aporte adecuado de folato [Wang et al, 2005]

Por otro lado, se ha descrito que la Hcy, de forma espontánea, se une a través de su grupo carboxilo, a los residuos de lisina de las proteínas [Jakubowski et al, 2006] o de otras moléculas, siendo las proteínas ricas en dominios EGF-like las más susceptibles al ataque de la Hcy [Krumdieck et al, 2000]. Este fenómeno, denominado homocisteinilación, es el responsable de gran parte de la toxicidad de la Hcy y su papel en la respuesta autoinmune.

1.2.2.5 Excitotoxicidad

La Hcy funciona como un aminoácido excitador, activando el grupo I de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) [Lazarewicz et al, 2003] y los receptores del N-metil-D-Aspartato (NMDAr) [Lipton et al, 1997]. Los productos de la oxidación y la transulfuración de la Hcy, como el ácido homocisteico, también son agonistas ionotrópicos y metabotrópicos de los receptores de glutamato [Shi et al, 2003]. In vitro, la Hcy es una neurotoxina débil, no obstante, cuando se le acompaña con glicina se potencia la excitotoxicidad de la Hcy mediada por NMDAr y mGluR provocando un aumento del inositol trifosfato (IP3) intracelular y la liberación de Ca^{2+} , aunque menos de lo que se espera en estas circunstancias, ya que la Hcy utiliza un mecanismo más independiente de Ca^{2+} que la glutamina [Zieminska et al, 2003; Zieminska et al, 2006].

Por otro lado, la Hcy actúa como agonista de los receptores del ácido gamma-aminobutírico A y B (GABA-A/B), que es el principal neurotransmisor inhibitorio del cerebro [Shastri et al, 2005] y también como agonista parcial de los receptores de glicina lo que provoca una reducción de la actividad de los NMDAr. Este ciclo de retroalimentación negativo previene la sobreestimulación de los NMDAr por la Hcy en condiciones fisiológicas. Pero en los

Introducción

casos de altos niveles de Hcy en sangre y la barrera hematoencefálica alterada, el cerebro se encuentra sometido a una sobreexcitación y se produce el daño excitotóxico [Lipton et al, 1997].

No obstante, se ha determinado que la vitamina E tiene un papel neuroprotector ya que evita la excitotoxicidad producida por la Hcy en los mGluR, bloqueando el acceso del ácido araquidónico al centro catalítico de la 12-lipooxigenasa (12-LOX) [Khanna et al, 2003]

Por último, en unos estudios realizados in vivo en los cuales demuestran que la HHcy crónica induce cambios en la plasticidad del hipocampo y disrupción en la transmisión sináptica, sugiriendo que los cambios podrían ser los responsables de la excitotoxicidad debida a la Hcy y su posible papel en la neurodegeneración [Christie et al, 2005].

1.2.3 Efectos de la Hcy promotores de la patofisiología de la EA esporádica

Los dos mecanismos principales propuestos como causa directa del daño neuronal en la EA son la acumulación de A β y la hiperfosforilación de tau. Además se han propuesto otros mecanismos que afectan indirectamente a la EA como los problemas cerebrovasculares y el fallo energético neuronal. La Hcy esta implicada en todos ellos.

Hay varios estudios que reconocen la HHcy como un factor de riesgo para la EA [Seshadri et al, 2002; de Silva et al, 2005]. Unos dicen que la HHcy está relacionada con el progreso y la severidad de la EA pero que no es un factor iniciador de la enfermedad [Postiglione et al, 2001]. Otros afirman, sin embargo, que la HHcy es un marcador temprano de la EA [Ravaglia et al, 2004b] o que la neurotoxicidad de la Hcy es debida a la activación del ácido homocisteico, pero no por si misma [Hasegawa et al, 2005]. Incluso afirman que no hay relación entre la HHcy y la EA [Agnati et al, 2005; Serot et al, 2005]

Los efectos de la carencia de vitaminas del grupo B (folato, B6 y B12) y sus posibles repercusiones sobre la HHcy han sido, también, ampliamente discutidos. Hay autores que afirman que incluir un suplemento vitamínico de folato y vitamina B12 en la dieta podría revertir los efectos nocivos de la HHcy [Obeid, 2006]. Otros, aunque también sustentan la hipótesis de los efectos beneficiosos de estas vitaminas frente a la HHcy, opinan que el suplemento vitamínico en la dieta no serviría ya que la cuestión radica en un problema genético [Malaguarnera et al, 2004]. Hay autores que apoyan que la carencia de folato en sangre es un factor de riesgo temprano, anterior a la HHcy [Quadri et al, 2004], incluso que la disminución de dichas vitaminas es un factor de riesgo independiente de la HHcy [Mizrahi et al, 2003; Kimura et al, 2004; Ravaglia et al, 2005a] o, simplemente, que no hay relación entre la EA ni con la HHcy ni con las vitaminas antes mencionadas [Joosten et al, 1997; Ariogul et al, 2005].

No obstante, gran parte de los autores coinciden en que la HHcy produce los efectos neurotóxicos que a continuación se describen.

1.2.3.1 Efectos directos sobre la EA

La acumulación del péptido A β se ha considerado un factor clave en la EA esporádica ya que, aparte de acumularse y formar las placas amiloides, el A β intracelular afecta a la funcionalidad de la mitocondria aumentando la viscosidad de la membrana mitocondrial, disminuyendo las reservas de ATP, inhibiendo los complejos de la cadena respiratoria, potenciando la producción de ROS (estrés oxidativo) y por último, liberando el citocromo c, lo cual señala apoptosis [Aleardi et al, 2005].

En un análisis de los componentes principales se obtuvieron dos grandes grupos que correlacionaban con la EA. Uno de ellos correspondía al grupo que englobaba las alteraciones del metabolismo de 1-carbono [Gottfries et al, 2001] más adelante se vio que el vínculo entre el metabolismo de 1-carbono y el péptido A β era la HHcy, las vitaminas

Introducción

B12, B6 y folato y los metabolitos relacionados con sus efectos. Para empezar, se observó una correlación positiva entre la Hcy y la concentración de A β [Flicker et al, 2004; Irizarry et al, 2005]. Se observó que la Hcy se une a A β favoreciendo su conformación en lámina beta y, por lo tanto, la formación de las β -fibrillas y el desarrollo de su neurotoxicidad [Agnati et al, 2007]. La Hcy potencia la toxicidad de péptido A β provocando apoptosis vía caspasa 3 [Mok et al, 2002].

La disminución de la concentración de SAM, ya sea por carencia de las vitaminas antes mencionadas o por la HHcy misma, provoca una disminución en las reacciones de metilación. La metilación de los promotores de PSEN1 [Scarpa et al, 2003; Cavallaro et al, 2006] y de la enzima de corte de la APP por la región beta (BACE) [Fuso et al, 2005] reduce la expresión de estas proteínas; en el momento en la que la metilación se minimiza, aumenta la transcripción de estos genes, incrementando, por ende, la concentración de A β [Scarpa et al, 2006]. Aunque, como siempre, hay argumentos en contra de esta hipótesis [Mulder et al, 2005]. En otros trabajos, por otra parte, achacan la inhibición de la remetilación a la inhibición de las metiltransferasas [Girgis et al, 1997] o a que la proteína HERP es la responsable de la sobreexpresión de la PSEN1 y la PSEN2 incrementando la producción de A β [Sai et al, 2002].

Se ha descrito, también, la acción agravada de la HHcy que, a la vez que incrementa la concentración del péptido A β , provoca neurotoxicidad y excitotoxicidad por sí misma [Shea et al, 2002]. O el efecto conjunto de la HHcy con altos niveles de A β : la HHcy (junto con bajos niveles de folato) provoca una disminución de SAM y al haber pocos donadores de grupo metilo disponible, se incorporan uracilos en el ADN, dañándolo, y reduce su reparación, lo que potencia enormemente la toxicidad de A β producida por la oxidación de las bases del ADN [Kruman et al, 2002] (Figura I-5).

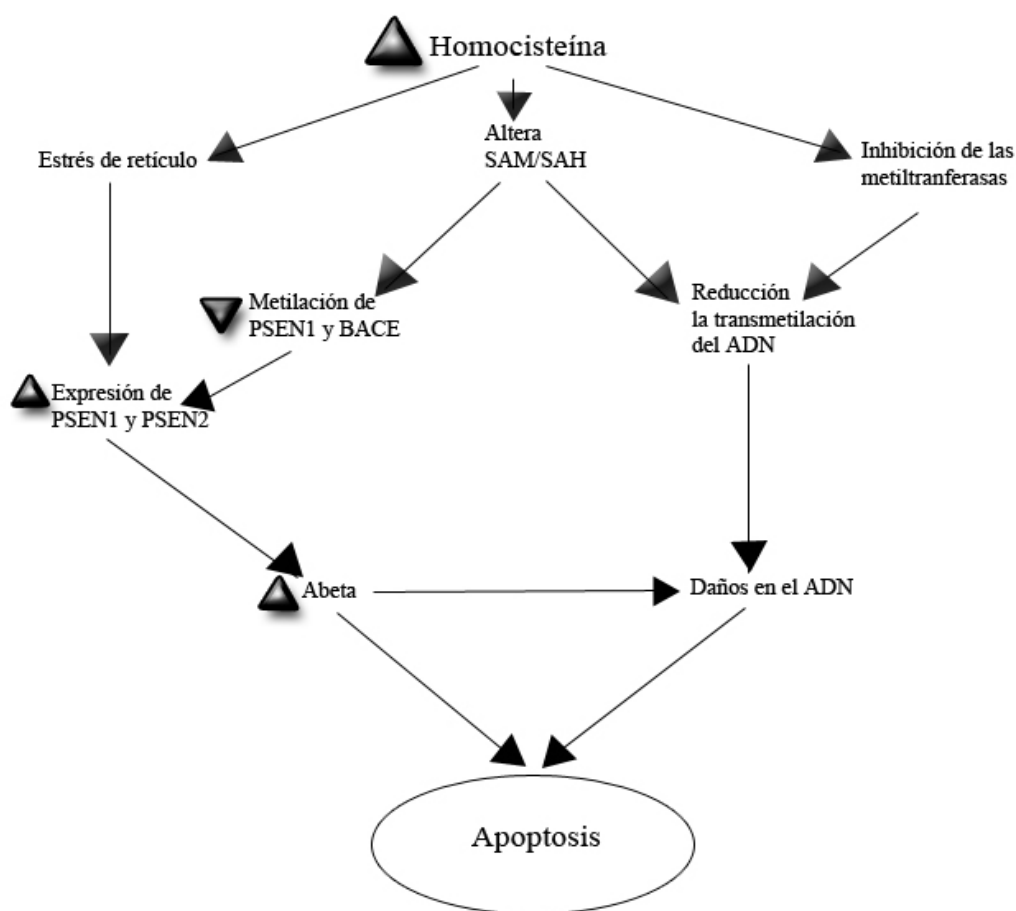


Figura I-5: Implicación de la hiperhomocisteinemia en la producción de Aβ y el daño en el ADN.

Por otro lado, se ha vinculado la HHcy, y la consecuente disminución de la metilación, con el aumento de tau hiperfosforilada, vía inhibición la de la fosfatasa 2A (PP2A) [Vafai et al, 2002] o promoviendo su fosforilación [Ho et al, 2002].

Finalmente, se ha vinculado la Hcy con proteínas relacionadas con el control de la división celular: la ciclina E y B. Las neuronas del hipocampo de pacientes de la EA con HHcy expresan más ciclina E pero no B, lo cual provoca, por parte de las neuronas, el abandono de la fase G0 y la inducción de su muerte al intentar dividirse infructuosamente [Nagy et al, 2000].

1.2.3.2 Efectos indirectos sobre la EA

Teniendo en cuenta la asociación entre las enfermedades cerebrovasculares y la EA, los factores de riesgo vascular son un tema a tener en cuenta entre los posibles factores que contribuyen a la EA.

La Hcy se ha postulado como un factor de riesgo para un cierto número de cambios cardiovasculares con efectos proaterogénicos y protrombóticos. Esos problemas circulatorios en el cerebro se han relacionado con el deterioro cognitivo [Sachdev et al, 2004]. Se ha visto que la Hcy incrementa tanto, la concentración de la proteína como la expresión del gen de la 3-hidroxy-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR), la cual está directamente relacionada con el metabolismo del colesterol. Por lo tanto, la Hcy produce su efecto aterogénico provocando estrés oxidativo a la vez que altera la vía del colesterol [Li et al, 2002].

Por otro lado, la Hcy tiene capacidad de dañar las células endoteliales de los vasos sanguíneos predisponiéndolos al desarrollo de aterosclerosis [Stein et al, 1998]. Además altera la actividad del activador del plasminógeno endógeno [Mayer et al, 1996], incrementa la agregación plaquetaria, activa los factores de coagulación V, Va, X y XII e inhibe factores anticoagulantes como antitrobina III y el sistema trombomodulina/ proteína C, favoreciendo la formación de trombos [Lentz et al, 1993] e induce el factor tisular.

Otro efecto indirecto de la Hcy sobre la EA, también relacionado con la circulación sanguínea, es que la Hcy causa una disrupción en la barrera hematoencefálica [Tyagi et al, 2005] provocando un aumento de entrada de Hcy en el cerebro, un posible riesgo de eventos inflamatorios en el encéfalo y facilitación de entrada de agentes tóxicos o infecciosos.

Por último, la Hcy provoca un deajuste energético en el cerebro. Se ha citado que la HHcy provoca in vitro en hipocampo de rata una disminución del CO_2 y de la actividad de la enzima citocromo C oxidasa (COX), mientras que se registra un aumento del lactato [Streck et al, 2003a] lo cual sugiere que la Hcy inhibe la respiración aeróbica, favoreciendo a su vez la anaeróbica. Esta hipótesis se ve apoyada con los resultados observados en otro experimento, donde se veía una disminución del CO_2 y de la entrada de glucosa, así como una inhibición de la succinato deshidrogenasa y la COX nuevamente, por efecto de la Hcy [Streck et al, 2003b], sugiriendo que el estado de precariedad energética al que están sometidas las neuronas podría estar relacionado con el deterioro neurológico, e indirectamente con la EA.

Objetivos

I Establecimiento de modelos celulares:

IA Obtención de un modelo celular para el estudio del efecto de la Hcy en el rango entre las concentraciones fisiológicas y la HHcy moderada en la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-MC. Caracterización del modelo mediante el análisis de la viabilidad celular y la muerte apoptótica.

IB Caracterización de un modelo de HHcy moderada en presencia de estrés oxidativo (EO) mediante el análisis de la viabilidad celular y la muerte apoptótica.

IC Caracterización del modelo de HHcy moderada en ausencia de folato, tanto en ausencia como en presencia de EO, mediante el análisis de la muerte apoptótica.

II Estudio genómico del modelo de HHcy moderada en ausencia y presencia de EO, mediante el análisis de la expresión génica diferencial y enriquecimiento funcional.

III Estudio de asociación caso-control de genes clave del ciclo del folato con la enfermedad de Alzheimer, en la población española.

Materiales y Métodos

3.1 MUESTRAS HUMANAS: PACIENTES Y CONTROLES

Se llevó a cabo un estudio caso-control sobre una muestra de 489 individuos, compuesta por 206 casos de EA esporádica, con una edad de aparición de los síntomas $72,4 \pm 5,2$ años (media \pm desviación estándar) y 283 controles sanos, con $73,3 \pm 5,3$ años en el momento del examen; con similares distribuciones de edad y sexo, con origen en la zona centro de España. Los casos fueron diagnosticados por Servicios Hospitalarios de Neurología como EA probable de acuerdo con los criterios NINCDS-ADRA [McKhann et al, 1984], o como demencia tipo Alzheimer mediante DSM IV [“Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders”. 1994; Wilson et al, 1994]. Los controles se sometieron a un test Mini Mental [Folstein et al, 1975]. Esta muestra había sido sometida previamente a un estudio del genotipo APOE y otros genes polimórficos asociados a la EA. [Bullido et al, 1998; Bullido et al, 2007]

3.2 LÍNEA CELULAR Y TRATAMIENTOS

3.2.1 Línea celular

En la realización del trabajo se ha utilizado la línea celular establecida de neuroblastoma humano SK-N-MC (ATCC, Ref. HTB-10). Las células se mantuvieron en medio mínimo esencial (MEM) (GibcoBRL) suplementado con el 10% de suero bovino fetal (Sigma), glutamina 2 mM, piruvato 1 mM, aminoácidos no esenciales (alanina, aspártico, glutamina, prolina y asparagina) y gentamicina y se cultivaron a 37°C en una atmósfera humificada con CO₂ al 7%.

3.2.2 Tratamientos

Los tratamientos estudiados en esta línea celular fueron la ausencia de folato y los

Materiales y métodos

estímulos: Hcy, la mezcla de xantina–xantina oxidasa (Xox), y la combinación de estos dos estímulos.

En todos los casos se sembraron las células en placas de seis pocillos (M-6) de Falcon, con un inóculo inicial de 800000 células/pocillo (cada pocillo lleva 2 ml de medio). Se trataron a las 24h de su siembra (cuando las células estaban en crecimiento exponencial) con el tratamiento correspondiente a cada experimento. La duración del tratamiento, así como la forma de recogida de las células tratadas dependió de los ensayos que se realizaron posteriormente con las muestras y se especifican en el apartado correspondiente a cada ensayo.

3.2.2.1 Ausencia de folato

En algunos experimentos la línea celular se mantuvo en medio MEM sin folato, que obtuvimos a partir de un MEM sin vitaminas al cual le añadimos todas las vitaminas de su composición (D-calcio pantotenato, nicotinamida, piridoxol clohidrato, riboflavina, tiamina clorhidrato, colina cloruro e i-inositol, todas de Sigma) a la concentración indicada, a excepción del folato.

En este tratamiento las células se sembraron en medio MEM sin folato, de la siguiente forma: Las células se tripsinizaron y se resuspendieron en medio MEM completo, y seguidamente se centrifugaron a 170g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se hizo un lavado con 10 ml con MEM sin folato al precipitado celular restante (resuspendiendo las células en los 10 ml, centrifugando nuevamente a 170g durante 5 minutos y volviendo a descartar el sobrenadante). Por último, el precipitado celular que quedó tras el lavado fue resuspendido en el medio MEM sin folato fresco al volumen oportuno para que quedase una concentración de 800000 células/pocillo para la siembra. A las 24h de la siembra se le aplicaron los estímulos oportunos, según el protocolo de cada experimento.

3.2.2.2 Homocisteína

A las 24h después de la siembra se añadió D,L-Hcy (Sigma) a diferentes concentraciones (desde 0 μ M a 200 μ M). En los experimentos con una concentración única de Hcy, la escogida fue 100 μ M (correspondiente a HHcy moderada). Las diluciones de Hcy se preparaban justo antes de añadirlas al cultivo para evitar que se oxidara la Hcy.

3.2.2.3 Xantina –xantina oxidasa (Xox)

La xantina es un potente generador de radicales libres de oxígeno (ROS), más concretamente de aniones $O_2^{\cdot -}$ [Vicente, 2007], por lo que su adición al medio de cultivo da lugar a una producción de $O_2^{\cdot -}$ mantenida en el tiempo. Por ello, se escogió este tratamiento como inductor de estrés oxidativo, menos agresivo que el H_2O_2 , y que simula mejor el estrés oxidativo crónico de la vejez.

La mezcla de la xantina (Sigma) (10 μ M) con la xantina oxidasa (Roche) (50mU/ml) se realizó también justo en el momento de tratar las células.

3.2.2.4 Tratamiento combinado

Este tratamiento es la combinación de la estimulación celular con los tratamientos (Hcy y Xox) simultáneamente para observar el efecto de la Hcy en presencia de estrés oxidativo. Las concentraciones de los estímulos utilizadas son las mismas que las empleadas para los tratamientos por separado. Este tratamiento combinado se ha realizado tanto en medio MEM normal como en medio MEM sin folato.

3.3 ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

3.3.1 Obtención de lisados celulares.

Las células, en las condiciones indicadas en cada apartado, fueron lisadas en el tampón de carga de electroforesis, compuesto por Tris-HCl (Merck) pH 6,3 25mM, glicerol al 10%, sulfato sódico de dodecilo (SDS) (BioRad) al 2%, beta-mercaptoetanol (Sigma) al 5% y azul de bromofenol (BioRad) al 0,01%, calentando a 100°C durante 5 minutos y pasando las muestras inmediatamente a 0°C durante 10 minutos para la correcta lisis celular. En este punto, las muestras se pueden almacenar a -70°C hasta su uso o usarlas a continuación.

3.3.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).

La cuantificación de las proteínas se realizó por el método de Bradford [Bradford et al, 1976], utilizando como patrón seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma) y el reactivo de Bradford de BioRad. La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS se realizó según el método discontinuo de Laemmli [Laemmli 1970]. Se utilizaron geles concentradores al 3% de acrilamida (BioRad) y geles separadores de porcentaje de acrilamida al 10%. Se usaron los siguientes patrones de peso molecular:

- Rainbow™ de alto peso molecular (Amersham Bioscience).
- Precision plus protein dual color Standard, también de alto peso molecular (BioRad)

3.3.3 Inmunomarcado después de electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se siguió el método de Harlow y Lane [Harlow et al. 1988]. Las proteínas resueltas en los geles de poliacrilamida se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa (BioRad) con un tamaño de poro de 0,45µm durante 90 minutos y una corriente de 1,3mA/cm² mediante el método de transferencia semiseca. Se comprobó la eficacia de la transferencia mediante tinción

reversible de las proteínas de la membrana con rojo Ponceau S (Sigma). La reactividad no específica fue bloqueada por incubación durante toda la noche a 4° C con BSA al 5% en tampón fosfato salino (PBS) y Tween 20 (Aldrich) al 0,2%. Las membranas se incubaron después durante 2 h a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos primarios:

- Anticuerpo de conejo específico para el fragmento p85 de PARP, policlonal (Promega) a una dilución 1:1000 (concentración final de 1µg/ml)
- Anticuerpo de ratón específico para α -tubulina (clon B-5-1-2), monoclonal (Sigma) a una dilución 1:10000 (concentración final de 0.1µg/ml)

Los anticuerpos se diluyeron en PBS con BSA al 3% y Tween 20 al 0,05%. Tras tres lavados en PBS-0,05% Tween-20, se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa (respectivamente):

- Anticuerpo de caballo anti-ratón marcado con peroxidasa (Vector) a una dilución 1:50000 (concentración final de 0.02µg/ml)
- Anticuerpo de cabra anti-conejo marcado con peroxidasa (Nordic) a una dilución 1:50000 (concentración final de 0.02µg/ml)

Las bandas inmunoreactivas se visualizaron con el reactivo quimioluminiscente ECL (Amersham Bioscience). Posteriormente, se cuantificaron las bandas resultantes mediante densitometría en el densitómetro GS-710 “Calibrated Imaging Densitometer” de BioRad.

En todos los casos se utilizó la cantidad de tubulina para normalizar la medida, ya que la cantidad de esta proteína se mantiene constante en las células. La tubulina se visualizó por inmunomarcado, como se ha descrito en el párrafo anterior, usando el anticuerpo primario específico para α -tubulina citado.

3.4 ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR

El análisis de la variabilidad celular se realizó mediante dos técnicas: el ensayo de MTT y la liberación de LDH.

3.4.1 Estudio de la viabilidad celular mediante ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

La sal de tetrazolio, MTT, es un compuesto que una vez internalizado por las células se reduce a formazán, un compuesto coloreado que puede ser cuantificado mediante un ensayo colorimétrico. La capacidad de reducción del MTT es indicativa del estado redox celular [Altman, 1976; Shearman et al., 1994; Shearman et al., 1995], y de la integridad mitocondrial [Rago et al., 1991; Berridge y Tan, 1993], por lo que es ampliamente utilizada para estudios de proliferación celular y citotoxicidad [Mosmann et al, 1983].

Las células (30000 células/pocillo (en 200 μ l de MEM)) se sembraron 48 horas antes de iniciar los tratamientos, en placas de 96 pocillos (Costar) y se mantuvieron a 37° C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 7%.

El ensayo MTT consistió en una modificación del protocolo original descrito por Hansen y cols. (1989). Dos horas antes de finalizar los tratamientos de los cultivos celulares se adicionó el MTT (stock 5 mg/ml en PBS) sobre el medio de cultivo a una concentración final de 0.5 mg/ml y se incubó durante 3 horas a 37° C, protegido de la luz. Transcurrido este tiempo, se añadió sobre el medio un volumen de 100 μ l de tampón de lisis (20% SDS en 50% N,N-dimetilformamida, pH 4.7) y se incubó toda la noche a 37°C en oscuridad. La cantidad de formazán producida se valoró midiendo la absorbancia del medio a una longitud de onda de 550 nm, utilizando como blanco una incubación libre de células, en un lector de placas de ELISA Microplate Reader model 680 (BioRad).

3.4.2 Estudio de la necrosis mediante el análisis de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

Las células (800000 células/pocillo) se sembraron 24 horas antes de iniciar los tratamientos, en placas de 6 pocillos (Falcon) en medio MEM suplementado con suero fetal bovino al 10% (2ml/pocillo) y se mantuvieron a 37° C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 7%.

Una vez transcurridas 24h de la siembra se procedió al tratamiento con Hcy, xantina (10µm)-xantina oxidasa (50mU/ml) o ambos tratamientos conjuntamente. Tras el tiempo especificado en cada experimento se procedió a recoger, de cada muestra, dos fracciones: por un lado una alícuota del medio celular (sobrenadante) y por otro, el precipitado celular que se obtuvo mediante raspado. Este último se lisó con triton X-100 (Sigma) al 9% durante 45 minutos a 37°C. Siguiendo las instrucciones del protocolo del kit Citotox-96, Non radioactive cytotoxicity assay (Bio-Rad) se consiguieron unos productos coloreados que se analizaron a 490nm en el espectrofotómetro microplate reader modelo 680 (Bio-Rad) obteniendo los datos de LDH liberada al medio del análisis de las alícuotas de sobrenadantes y, del análisis de los lisados celulares, los datos de LDH interna. Para calcular el porcentaje de mortalidad por necrosis se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ MORTALIDAD} = \frac{\text{LDH LIBERADA}}{(\text{LDH INTERNA} + \text{LDH LIBERADA})} \times 100$$

La LDH liberada corresponde a células muertas durante el tratamiento, mientras que la LDH interna corresponde a la LDH extraída de las células supervivientes. La relación de la LDH liberada frente al total de LDH medida, refleja el porcentaje de células muertas en el cultivo frente al número total de células.

Materiales y métodos

Y una vez conocido el % de mortalidad, se calculó el % de la viabilidad de la siguiente forma:

$$\% \text{ VIABILIDAD} = 100 - \% \text{ MORTALIDAD}$$

3.5 ANÁLISIS DE LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS.

EL análisis de la apoptosis en el modelo celular se realizó mediante el estudio de dos marcadores apoptóticos: la proteólisis de PARP por western blot del fragmento p85 y la fragmentación del ADN mediante citometría de flujo en presencia de yoduro de propidio.

3.5.1 Estudio de la apoptosis mediante la cuantificación de la proteólisis de PARP.

La proteólisis de PARP por las caspasas da lugar al péptido p85 al cual es un indicador de actividad en la cascada de las caspasas [Kauppinen et al, 2007]. La medida la cantidad de p85 celular mediante western blot, realizado como se detalla en el apartado 3.3, nos permitió saber si las células tratadas habían entrado en el proceso de muerte por apoptosis.

3.5.2 Estudio de la apoptosis mediante citometría de flujo en presencia de yoduro de propidio

Las células SK-N-MC se sembraron en una placa de 6 pocillos M-6 (Falcon) (800000 células/pocillo de inóculo inicial) y se incubaron durante 48 o 72 h (según el experimento) en medio MEM suplementado con suero fetal bovino al 10% al que se añadió Hcy, xantina (10µm)-xantina oxidasa (50mU/ml) o ambos tratamientos conjuntamente. Como control se llevaron las mismas células sin estimular. Después se lavaron extensivamente con PBS y

y se levantaron del soporte plástico mediante raspado. A continuación se fijaron con etanol (Merck) al 30% en PBS durante, al menos, 12 h a 4°C, tras lo que se centrifugaron a 800g durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se lavaron primero con etanol al 70% y después con PBS, seguido de centrifugación en ambos casos. Las células se incubaron, por último, durante 45 minutos a 37°C, con: citrato sódico al 0,1%, NP-40 (Fluka) al 0,3%, yoduro de propidio (Sigma) 0,05mg/ml (que se intercala entre la cadena de DNA y sirve para su detección) y RNAsa A (Boehringer Mannheim) 0,02 mg/ml. Las células fijadas y tratadas fueron analizadas posteriormente mediante citometría de flujo usando el citómetro FACScalibur (BD Biosciences). El porcentaje de células con el ADN fragmentado (señal tardía de apoptosis) en cada tratamiento se calculó utilizando el programa Cell Quest (BD Biosciences), eliminando del análisis los agregados celulares.

3.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL

3.6.1 Microarrays de ADN

Se llevó a cabo un análisis de la expresión génica tras el tratamiento con Hcy sólo o conjuntamente con la inducción de estrés oxidativo en cultivos de neuroblastoma SK-N-MC. Las células SK-N-MC se incubaron durante 18h en medio MEM suplementado con suero fetal bovino al 10% al que se añadió Hcy 100 µM con xantina 10µM y xantina oxidasa 50mU/ml o no se añadió estímulo (control). Pasado este tiempo se procedió a la extracción del ARN total de los lisados de las células tratadas, con el kit High Pure RNA Isolation Kit (Roche) y siguiendo las instrucciones del fabricante (todos los reactivos utilizados están libres de ribonucleasas). Con el fin de valorar la calidad y cantidad de ARN obtenido, se tomó una alícuota de 1µl de cada muestra y se analizó mediante el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. El ARN aislado fue enviado a la unidad de genómica del CNIC, donde se realizaron los experimentos de análisis de la expresión génica, utilizando el microarray *Human*

Materiales y métodos

Genome Survey Microarray V 2.0 (AppliedBiosystems) que tiene sondas para 29098 genes humanos. El experimento se realizó por triplicado, utilizando cultivos independientes (réplicas biológicas). Los datos obtenidos de los microarrays fueron analizados mediante el programa de análisis de microarrays Spotfire®. Para el enriquecimiento biológico de los datos se utilizaron las herramientas de expresión génica asociadas a la base de datos Panther® (Applied Biosystems), y las aplicaciones bioinformáticas Genecodis [Carmona-Saez et al, 2007] y GSEA [Subramanian et al, 2005]

3.6.1.1 Fundamentos de la tecnología del microarray Human Genome Survey Microarray V2.0

La tecnología de este microarray está basada en un sistema de detección quimioluminiscente altamente sensible y preciso. El microarray consta de unos 30000 spots en cada uno de los cuales se encuentra una sonda de aproximadamente 60 pares de bases específica para un transcrito humano, y otra sonda de unos 40 pares de bases que emite una señal fluorescente, que sirve para normalizar la señal quimioluminiscente específica.

Una vez obtenidas las muestras de ARN de cadena +, se obtuvo el ADN complementario marcado con digoxigenina, utilizando el Chemiluminescent RT Labeling Kit de Applied Biosystems. El ADN complementario marcado con digoxigenina hibridó con el microarray y se midieron la quimioluminiscencia y la fluorescencia producida en el aparato AB1700 Chemiluminescent microarray analyzer, utilizando el Chemiluminescence Detection Kit el cual, mediante la unión de un anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina, detecta la hibridación de la muestra con la sonda del microarray y emite quimioluminiscencia que, a su vez es detectada por el aparato

3.7 ESTUDIO DE ASOCIACION GENÉTICA CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

3.7.1 Selección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de los genes candidatos

Los genes más relevantes en el metabolismo de la Hcy fueron objeto de un estudio para seleccionar algunas de las variaciones de un solo nucleótido (SNP) que tienen dichos genes. Se escogieron los SNPs que podrían provocar un cambio funcional en los genes candidatos y se realizó la consiguiente genotipificación de la muestra caso-control para dichos SNPs.

Los SNPs seleccionados fueron los siguientes (tabla M-1):

Tabla M-1: Los genes con sus respectivos SNP analizados en el estudio de asociación (caso-control).

Gen		SNP	
Nombre	ID . Entrez	Nombre	ID. dbSNP
MTHFR	4524	C677T	rs1801133
		A1298C	rs1801131
MTRR	4552	G66A	rs1801394

Se especifica el nombre del gen y su número de identificación de Entrez. A su vez, se nombran los SNP estudiados y su código de identificación dbSNP

Estos SNPs fueron analizados mediante sondas de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) en el termociclador Lightcycler® (Roche) (MTHFR C677T y A1298C) o con sondas TaqMan–MGB en el termociclador ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) (MTRR G66A).

3.7.2 Genotipificación con sondas FRET

3.7.2.1 Fundamentos sobre el funcionamiento de las sondas FRET

El método de sondas FRET consiste en el uso de dos sondas de hibridación las cuales hibridan con secuencias adyacentes internas del molde. La sonda que se encuentra más a 5' (la donante) tiene un extremo 3' marcado con fluoresceína, mientras que la sonda que está en el extremo 3' del conjunto (la aceptora) tiene su 5' marcado con fluoróforos Lightcycler-Red 640 o Lightcycler-Red705, de Roche®. Estas sondas se basan en el efecto FRET que consiste en una transferencia de energía dependiente de la distancia entre dos fluoróforos adyacentes sin la emisión de un fotón. Durante el anillamiento en la reacción de cadena de la polimerasa (PCR), las dos sondas hibridan, a 2-5 nucleótidos de distancia una de la otra, en la misma cadena del molde. Los fluoróforos acoplados a las sondas, ahora estarán muy próximos en la estructura híbrida. El fluoróforo donante (fluoresceína) se excita mediante una fuente externa de luz y pasa parte de su energía de excitación al fluoróforo adyacente aceptor (Red640 o 705), y este último, excitado, emite una luz medible que es registrada por el aparato Lightcycler (figura M-1).

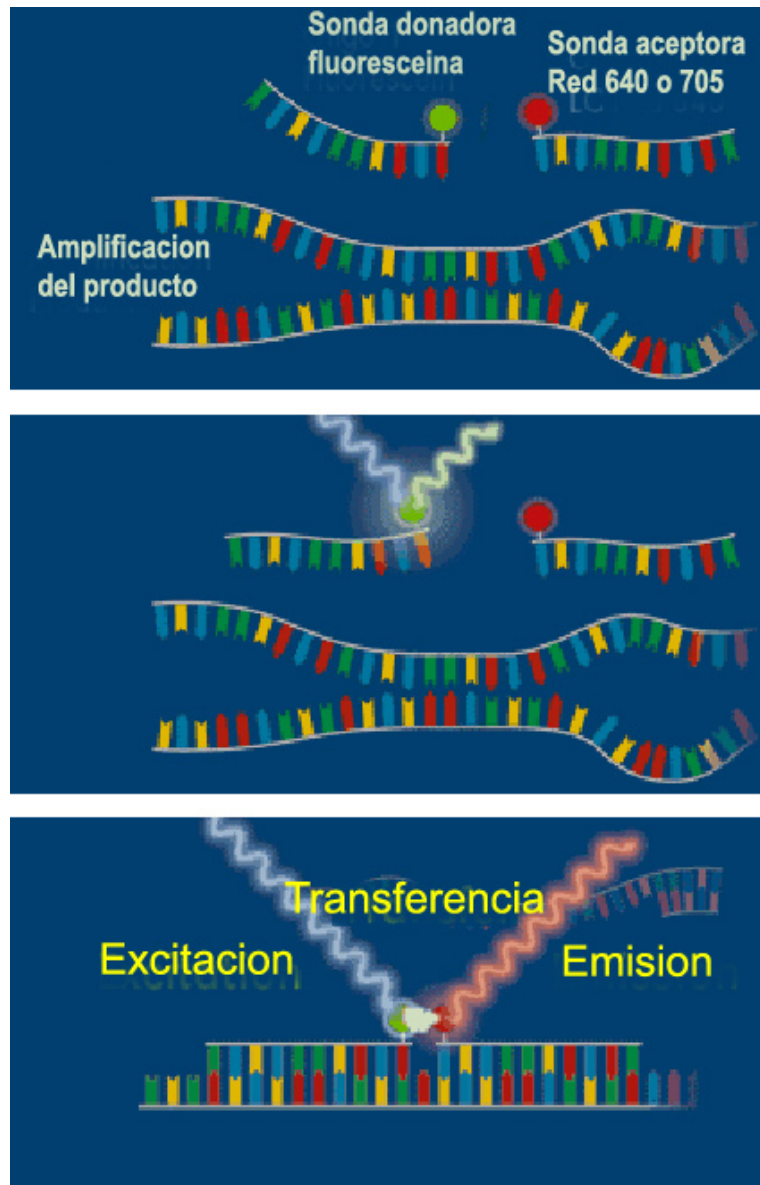


Figura M-1: Sistema de sondas FRET. La transferencia de energía solo se realiza si las dos sondas han hibridado en zonas adyacentes del ADN.

Así en la mezcla de reactivos para la PCR se añaden las 2 sondas cada una marcada con un fluoróforo distinto, las cuales hibridan perfectamente con uno de los alelos. El programa de PCR termina con una desnaturalización lenta donde, una vez alcanzada la temperatura de fusión (T_m) de la sonda, ésta se desprende del producto y la fluorescencia emitida sufre una caída hasta niveles basales. La temperatura de fusión es mayor para la variante

Materiales y métodos

alélica que hibrida perfectamente con la sonda, que para el otro alelo, con el que la sonda presenta un desapareamiento, y esta diferencia es lo que nos permite asignar el genotipo.

3.7.2.2 Genotipificación de los polimorfismos C677T y A1298G del gen MTHFR

Las concentraciones de reactivos y las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- Para el SNP C677T: (rs1801133, Ala222Val).

Se utilizó el kit de Roche® (LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes) a las concentraciones optimizadas para esta PCR (MgCl_2 a 3mM) al cual se le añadió los cebadores ($0.5\mu\text{M}$) y las sondas ($0.2\mu\text{M}$).

Proceso: PCR a tiempo real	PASOS	Temperatura	Tiempo
	Preincubación	95°C	10 minutos
Nº de ciclos:40	Desnaturalización	95°C	10 segundos
	Anillamiento	55°C	10 segundos
	Elongación	72°C	15 segundos

Se realizaron 40 ciclos tal y como se detalla en la tabla superior. Finalmente se realizó una desnaturalización lenta que consistió en un aumento de la temperatura hasta 94°C e inmediatamente bajar hasta 40°C donde se mantuvo 5seg, y a continuación inició un aumento progresivo de la temperatura a razón de $0.1^\circ\text{C}/\text{seg}$, hasta llegar a los 80°C. Por último, se produjo un enfriamiento a 40°C durante 30seg.

El producto que tiene una T_m de 61.5°C representa al alelo "C" y de 53.5°C al alelo "T".

Las secuencias de cebadores y sondas fueron (5'→3'):

Cebador-U: CGAAGCAGGGAGCTTTGAGGCTG

Cebador-L: AGGACGGTGCGGTGAGAGTG

Sonda Donadora: TGACCTGAAGCACTTGAAGGAGAAGGTGTC-fluoresceína

Sonda Aceptora: LCRed640 CGGGAGCCGATTTCATCAT

El tamaño del amplificado es de 233 pb.

- Para el SNP A1298C: (rs1801131, Glu429Ala)

Se utilizó el kit de Roche® (LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes) a las concentraciones optimizadas para esta PCR (MgCl₂ a 3mM) al cual se le añadió los cebadores (0.6µM) y las sondas (0.1µM).

Proceso: PCR a tiempo real	PASOS	Temperatura	Tiempo
	Preincubación	95°C	10minutos
Nº de ciclos:50	Desnaturalización	95°C	15 segundos
	Anillamiento	57°C	15 segundos
	Elongación	72°C	15segundos

Se realizaron 50 ciclos tal y como se detalla en la tabla superior. En este caso, en la desnaturalización lenta se mantuvo la temperatura 120seg. a 94°C, bajó a 50°C donde se mantuvo otros 120seg. y finalmente subió a 75°C. Por último se realizó un enfriamiento a 40°C durante 30seg.

El producto con Tm de 64°C representa al alelo "A" y de 58°C al alelo "C".

Materiales y métodos

Las secuencias de los cebadores y sondas fueron (5'→3'):

Cebador-U: GCAATTCCTCTTCCCCTGCC,

Cebador-L: TCCCCACTTCCAGCATCACTC,

Sonda Donadora: CTTCAAAGACACTTTCTTCACTGGTC-fluoresceína.

Sonda Aceptora: LCRed640-CTCCTCCCCCCCACATCTTCAGCAG.

El tamaño del amplificado es de 202pb.

El genotipado de estos SNP por el sistema de sondas FRET fue realizado en colaboración con Ana Martínez García.

3.7.3 Genotipificación con sondas TaqMan-MGB

3.7.3.1 Fundamentos sobre el funcionamiento de las sondas

La reacción de PCR explota la actividad 5' nucleasa de la polimerasa usada, AmpliTaq Gold DNA Polymerase, para romper la sonda TaqMan durante la PCR. La sonda TaqMan-MGB contiene una marca reportera (R) fluorescente en el extremo 5' (puede ser FAM, o VIC) y en 3' un captador de fluorescencia o "quencher" no fluorescente (Q) y otra modificación denominada MGB (minor groove-binder) que se une al surco menor del ADN favoreciendo la unión de la sonda al molde. Durante la reacción, la ruptura de la sonda provoca la separación del R y el Q, lo que hace que aumente la fluorescencia de la marca reportera (R). La acumulación de los productos de PCR es detectada directamente mediante la monitorización del aumento de la fluorescencia (figura M-2).

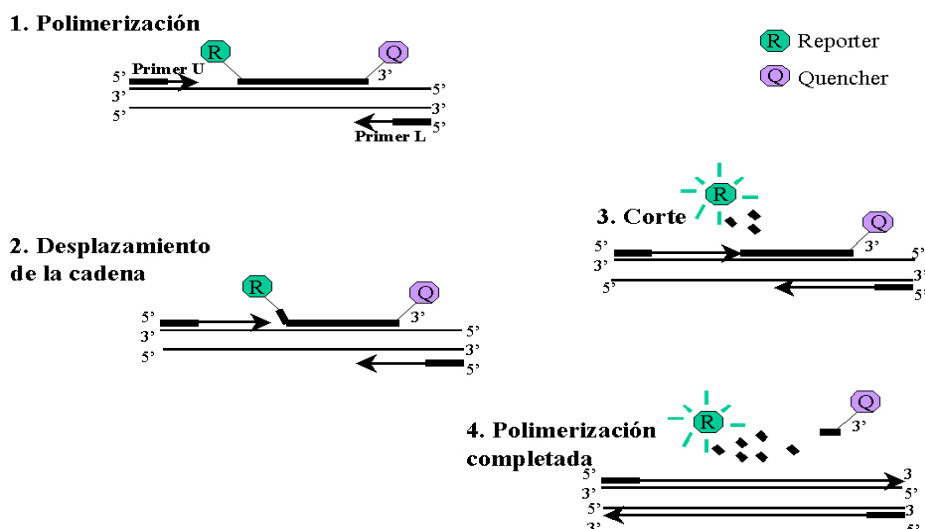


Figura M-2: Esquema de la actividad de la sonda TaqMan-MGB.

Cuando la sonda está intacta (1), la proximidad del reportero (R) y del captador (Q) hace que se suprima la fluorescencia por la transferencia de energía de tipo Förster [Förster et al, 1948; Lakowicz et al, 1983]. Durante la PCR, cuando la sonda se anilla específicamente a su secuencia de DNA diana, lo hace entre los iniciadores directo e inverso (2). La actividad nucleolítica 5'-3' de la AmpliTaq polimerasa rompe la sonda unida al DNA (3), los fragmentos son desplazados y la polimerización de la cadena continúa (4). Este proceso ocurre en cada ciclo de la PCR y no interfiere con la acumulación exponencial del producto, que correlaciona con la acumulación de la fluorescencia.

Estas sondas son muy útiles para genotipar con alto rendimiento (High Throughput). La región genómica que incluye el SNP se amplifica en presencia de dos sondas TaqMan® (una que hibride perfectamente con cada alelo y su región flanqueante), cada una de ellas con una marca fluorogénica diferente, de tal modo que la señal de cada una se libera (se observa un aumento de fluorescencia) sólo en presencia del alelo con el que hibridan perfectamente.

Tras el proceso de PCR-genotipificación obtenemos un gráfico como el mostrado en la figura M-3.

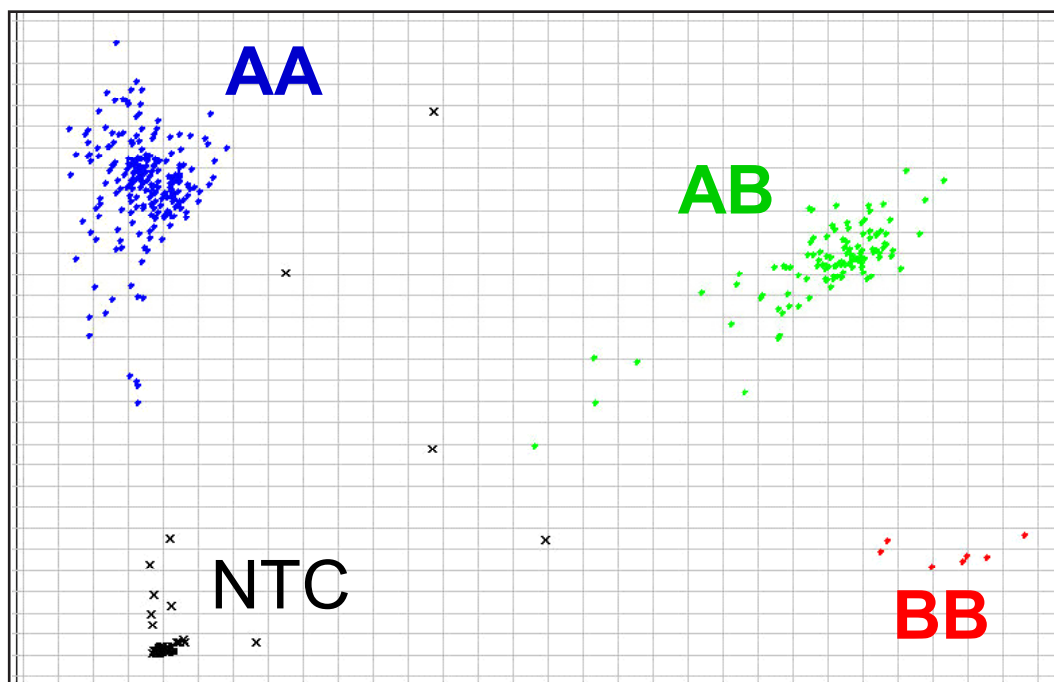


Figura M-3. La nube de puntos azules representa a aquellos individuos para los que en el proceso de amplificación se ha observado un aumento de fluorescencia de una de las marcas (la de la sonda TaqMan-MGB que hibrida con el alelo “A”); la nube de puntos rojos representa a los individuos para los que se ha observado un aumento de fluorescencia de la otra marca (la de la sonda que hibrida con el alelo “B”) y la nube de puntos verdes representa a los individuos para los que se ha observado aumento de fluorescencia de ambas marcas (los individuos heterocigotos). Los puntos negros (NTC) representan los controles negativos de la PCR.

3.7.3.2 Genotipificación del polimorfismo del gen MTRR

Esta técnica se ha empleado para el SNP A66G del gen MTRR cuyo protocolo fue diseñado por Applied Biosystems (ensayos “On Demand”). Al solicitarlo la casa comercial envió un kit con los reactivos, de modo que no se conoce la concentración de los reactivos (TaqMan® Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG 2x), ni la secuencia de los cebadores y sondas que se encuentran ya mezclados en el reactivo 20x Assays-on-Demand™ C_3068176_10.

La PCR se realizó en el termociclador ABI PRISM-7900HT según el siguiente protocolo:

Proceso: PCR a tiempo real	PASOS	Temperatura	Tiempo
	Preincubación	95°C	10 minutos
Nº ciclos: 40	Desnaturalización	92°C	15 segundos
	Anillamiento y elongación	60°C	1 minuto

Resultados

4.1 EFECTO DE LA HOMOCISTEÍNA A CONCENTRACIONES FISIOLÓGICAS Y DE HIPERHOMOCISTEINEMIA MODERADA EN UN MODELO NEURONAL HUMANO.

Con el propósito de investigar cuáles son los efectos producidos por la Hcy en neuronas humanas, se propuso fijar un modelo celular en el neuroblastoma colinérgico humano SK-N-MC. Su caracterización se desarrolló a través del estudio de la viabilidad celular, determinando la reducción de MTT y la liberación de LDH, y por el estudio de la apoptosis celular mediante el análisis de la proteólisis de PARP y de la fragmentación del ADN.

Se fijó una curva de dosis de D,L-Hcy de 0 a 200 μ M para el tratamiento de las células. Se recogieron las muestras a diferentes tiempos y, posteriormente, se realizaron los análisis antes mencionados.

4.1.1 Estudio de la viabilidad celular

Para valorar el efecto de la Hcy sobre la viabilidad celular empleamos dos métodos distintos: el ensayo de MTT y la liberación de LDH.

4.1.1.1 Estudio de la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT

La capacidad de reducción de la sal de tetrazolio (MTT) por las células es un indicador de su estado redox, de la integridad mitocondrial y por lo tanto, marcador de viabilidad y proliferación celular.

Los resultados obtenidos tras el estudio de la viabilidad celular con MTT a las 24h, a concentraciones comprendidas entre 0 y 200 μ M de Hcy, muestran un aumento significativo de la viabilidad celular a las concentraciones 10, 100 y 200 μ M respecto al control. Se pudo observar que la señal aumentaba proporcionalmente con la concentración de Hcy

Resultados

sugiriendo que la Hcy promovía la viabilidad celular incluso a concentraciones muy altas (1mM, no mostrado) (figura R-1). Este resultado, contrario a lo esperado, está descrito en la bibliografía y se atribuye a que la Hcy incrementa el metabolismo mitocondrial aumentando la señal de éste marcador y enmascarando su posible efecto sobre la viabilidad celular [Tyagi et al,2005a]. Por lo tanto, descartamos esta técnica para analizar la supervivencia celular de la línea SK-N-MC tratada con Hcy.

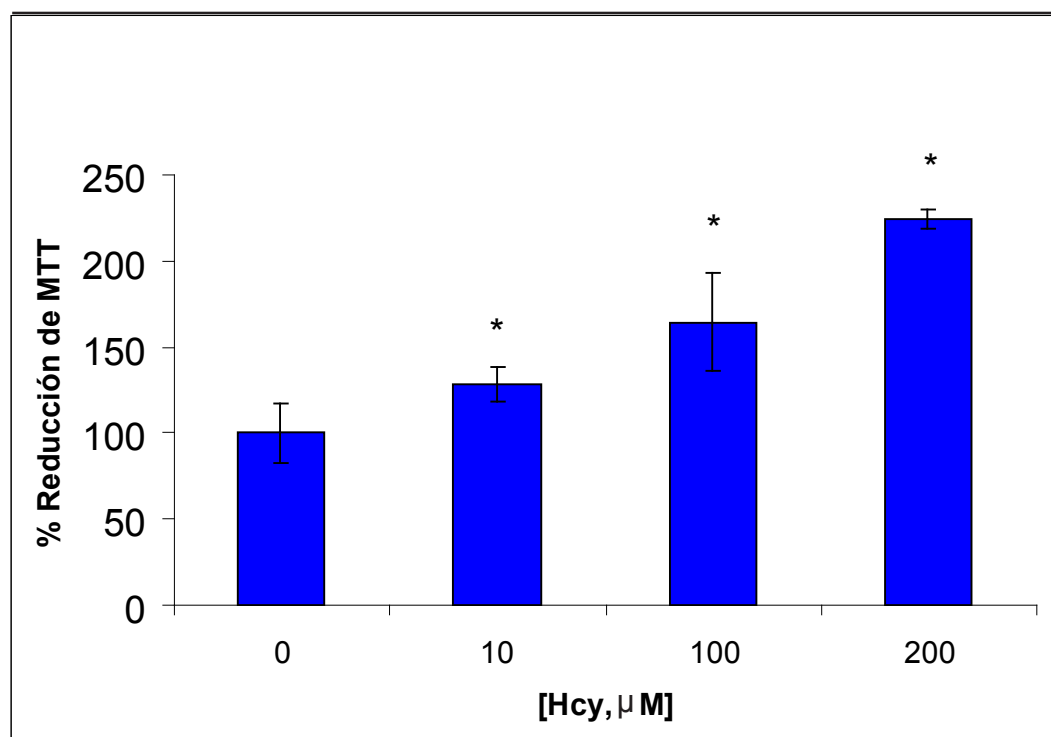


Figura R-1: Efecto de la Hcy sobre la viabilidad celular. Reducción de MTT a las 24h. El asterisco indica que el dato es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) frente al control. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

4.1.1.2 Estudio de la viabilidad celular mediante la liberación de LDH

La liberación de la enzima LDH es un marcador de muerte celular, más específicamente de necrosis, ya que esa enzima solamente se encuentra en el medio cuando se ha roto la membrana celular y se ha liberado el contenido citoplasmático al medio.

En una primera aproximación, realizamos un estudio de los efectos de la concentración de la Hcy sobre la liberación de LDH a las 24h. Como se puede observar en la figura R.-2a, la viabilidad celular, analizada tal como se indica en el apartado 3.4.2 de Materiales y Métodos, se mantiene prácticamente constante a concentraciones de Hcy comprendidas entre 0 y 100 μ M, cayendo un 20 % a concentraciones de 200 μ M. Por lo tanto, se determinó que la concentración de 100 μ M de Hcy era la más adecuada para simular un estado de HHcy moderada, ya que era la concentración más alta de Hcy a la que puede realizar sus efectos, sin reducir significativamente la viabilidad celular, pudiéndose asimilar el modelo a los efectos subletales de la Hcy, que se cronifican en los pacientes con hiperhomocisteinemia moderada.

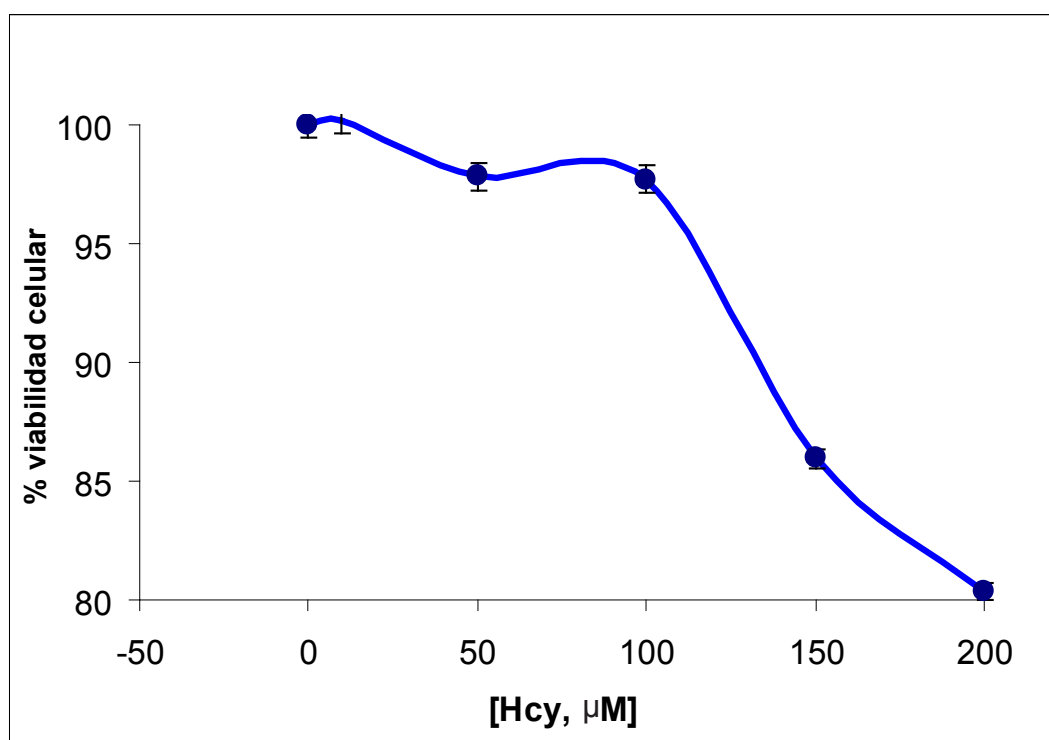


Figura R-2a: Efecto de la Hcy sobre la viabilidad celular. Estudio de la liberación de LDH a las 24h. Se calculó el porcentaje de viabilidad como se indica en Materiales y Métodos. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

Resultados

Posteriormente, se realizó un seguimiento de la viabilidad celular a los tiempos 24, 36 y 48h, para comprobar si la viabilidad a las concentraciones de Hcy comprendidas entre 0 y 100 μ M se mantenía a lo largo del tiempo. Las concentraciones de Hcy escogidas fueron 0 μ M (como control), 10 μ M (concentración fisiológica dentro del rango de la normalidad) y 100 μ M (concentración dentro del rango de HHcy moderada y concentración límite del mantenimiento de la viabilidad según el experimento anterior). Los resultados obtenidos de este experimento confirmaron que, a las 24h la viabilidad celular se mantenía estable. A las 36h, la viabilidad caía ligeramente en el control pero no se afectaba por la Hcy a 10 y 100 μ M. A las 48h, la viabilidad celular cayó un 20% aproximadamente en el control y, paradójicamente, a concentraciones mayores de Hcy (10 y 100 μ M) no sólo se mantuvo la viabilidad celular sino que hubo una recuperación de la misma, pequeña (de un 10%) pero significativa. (figura R-2b).

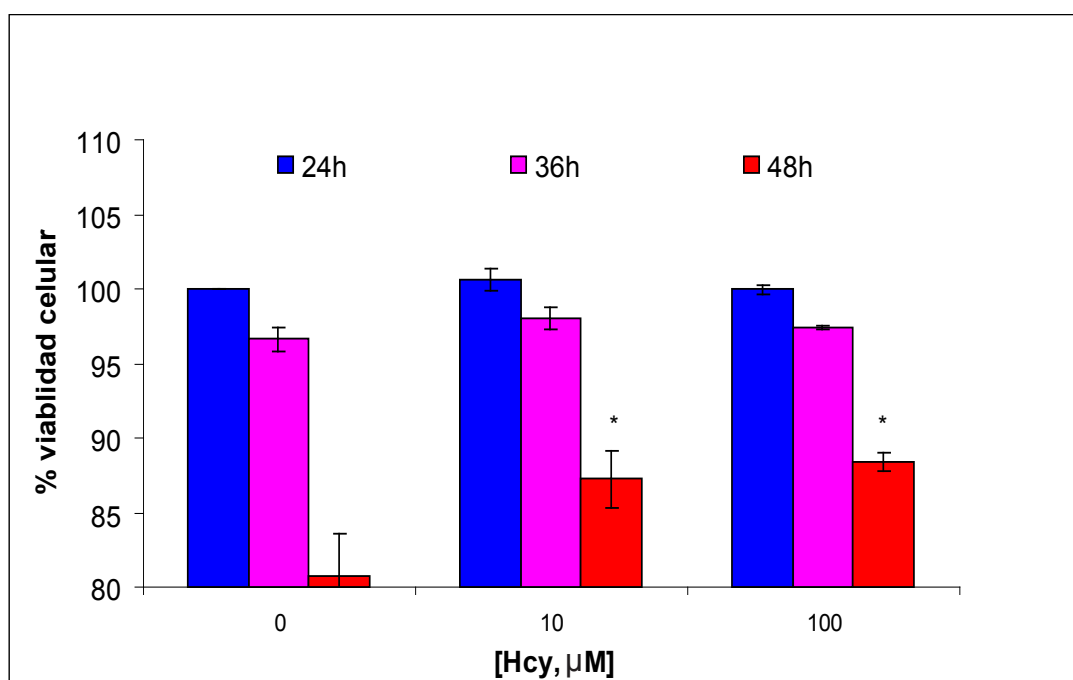


Figura R-2b: Efecto de la Hcy sobre la viabilidad celular. Estudio de la liberación de LDH a las 24h, 36h y 48h. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

4.1.2 Medida de la inducción de apoptosis

Para valorar el efecto de la Hcy sobre la apoptosis celular empleamos dos técnicas distintas: el estudio de la proteólisis de PARP y el estudio de la fragmentación del ADN.

4.1.2.1 Estudio de la inducción de apoptosis mediante la proteólisis de PARP

La proteólisis de la proteína poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) por parte de las caspasas da como resultado un péptido de 85KDa (p85) que es un indicador de que la cascada de las caspasas está activa. Por consiguiente, la determinación del fragmento p85 en la muestra nos sirve como marcador, en último término, de muerte por apoptosis.

Se estudió la proteólisis de PARP, tal como se describe en el apartado 3.3 de Materiales y Métodos, a tres tiempos: 24, 36 y 48h. Las concentraciones escogidas fueron del rango de 0 a 100 μ M, como en el caso del análisis de la viabilidad. Las medidas de la densidad óptica (D.O.) de p85 se normalizaron con las medidas de D.O. obtenidas de la tubulina, una proteína ubicua y de concentración inalterable por los tratamientos realizados.

Los resultados obtenidos mostraron que a las 24h no había señal de p85, por lo tanto, era un tiempo demasiado temprano para que se produjera la proteólisis de PARP. A las 36h, ya se registró señal de p85 aunque ésta disminuyó con el aumento de la concentración de Hcy, siendo la disminución estadísticamente significativa a 100 μ M de Hcy. A las 48h, la señal de p85 se mantuvo sin cambios significativos entre la Hcy y el control. (figura R-3).

Resultados

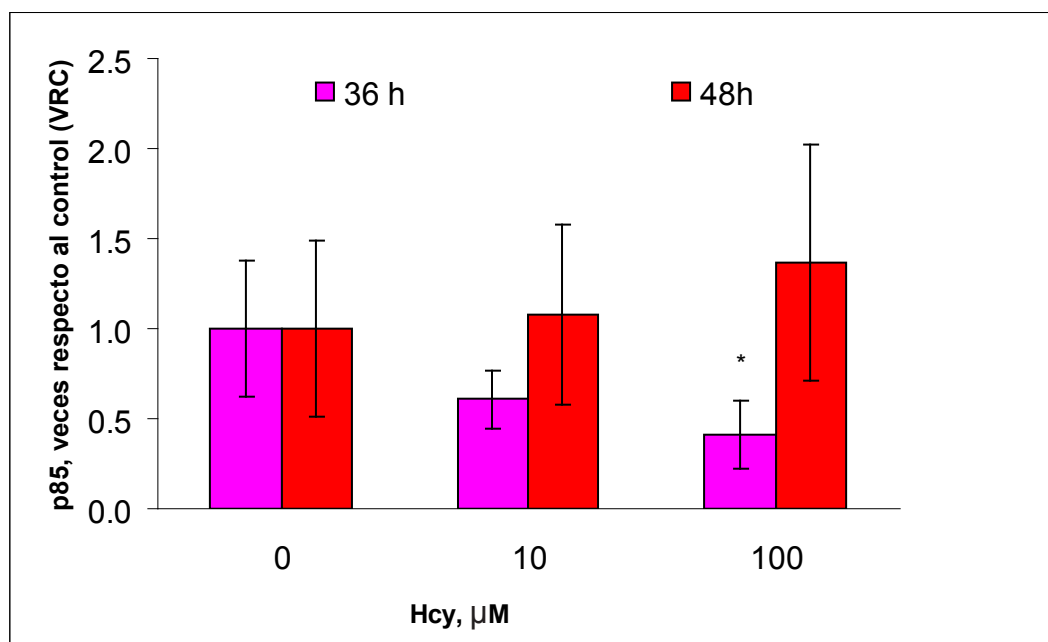


Figura R-3: Efecto de la Hcy sobre la apoptosis. Estudio de la proteólisis de PARP a los tiempos de 36h y 48h. Se calculó la cantidad del fragmento p85 en unidades arbitrarias (u.a., D.O. de p85/ D.O. de tubulina) y se normalizó a cada tiempo frente a su control (0 μM). El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

4.1.2.2 Estudio de la inducción de apoptosis mediante la determinación de la fragmentación del ADN

Para continuar con el estudio de la apoptosis por efecto de la Hcy medimos la fragmentación del ADN como marcador tardío de la cascada apoptótica. La fragmentación del ADN se determinó por citometría de flujo como se indicó en el apartado 3.5.2 de Materiales y Métodos.

Se realizó un estudio preliminar a las 48h con concentraciones de Hcy dentro del rango de 0 a 200 μM . Los resultados obtenidos (figura R-4a) mostraron que no había variación significativa en el porcentaje de células con el ADN fragmentado (células en subG₀).

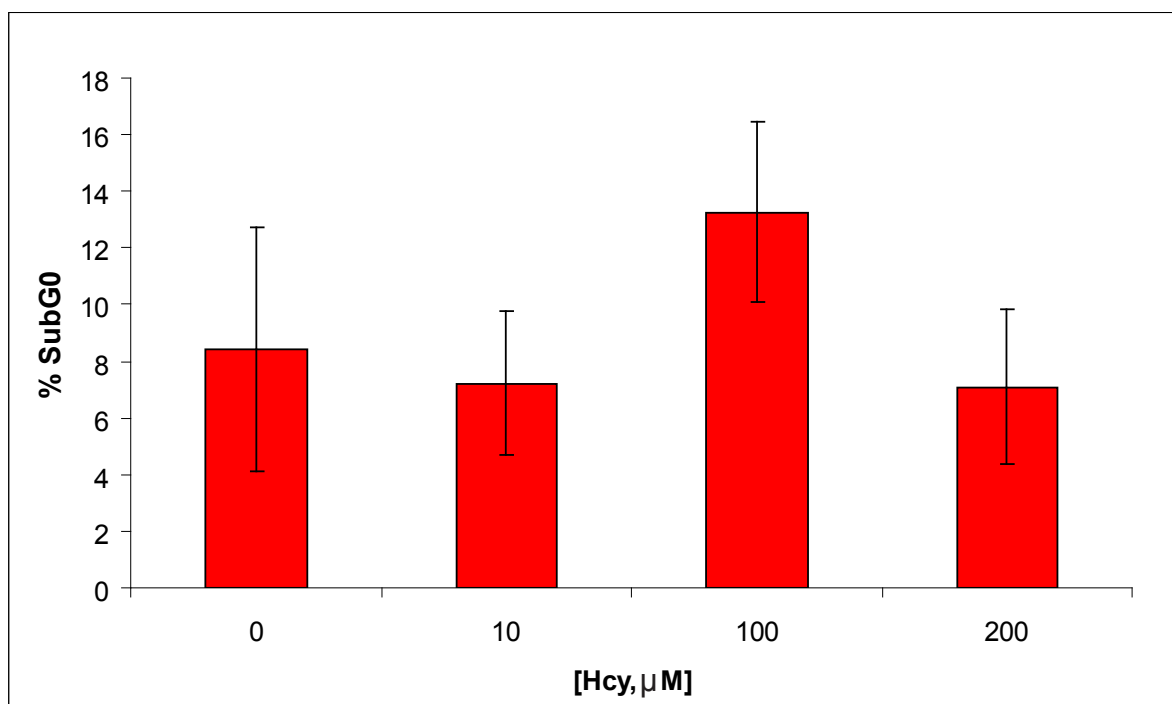


Figura R-4a: Efecto de la Hcy sobre la apoptosis. Estudio preliminar de la fragmentación de ADN a las 48h. Se representa el porcentaje a de las células con un contenido de ADN íntegro menor que las células en G1-G0 (SubG₀) tras la tinción con yoduro de propidio, analizado por citometría de flujo. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

Para estudiar más a fondo este proceso, se realizó un seguimiento a tiempos largos (48 y 72h) del efecto de la Hcy a 100 μM (HHcy moderada).

A las 48h, tal como se observa en la figura R-4b, no hubo variación en el porcentaje de las células con el ADN fragmentado (células en subG₀) a 100 μM de Hcy respecto el control. Sin embargo, a las 72h sí observamos una disminución de la fragmentación del ADN estadísticamente significativa a 100 μM de Hcy.

Este resultado a las 72h sugiere un cierto papel protector a la Hcy a largo plazo, que replica la tendencia observada a 36h en la proteólisis de PARP.

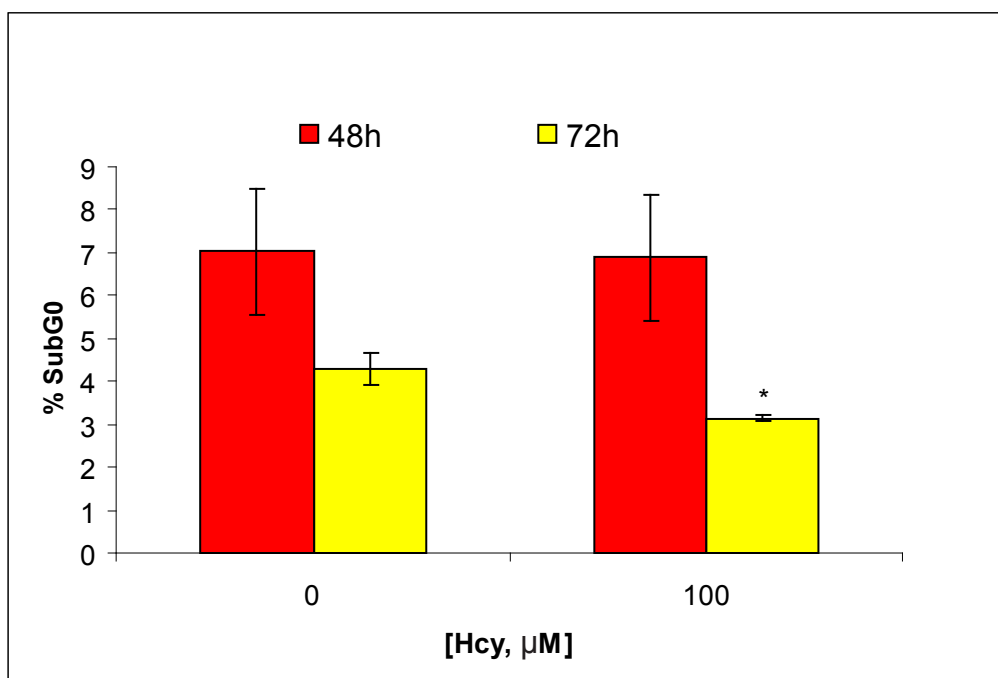


Figura R-4b: Efecto de la Hcy sobre la apoptosis. Estudio de la fragmentación de ADN a las 48h y 72h. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

4.2 EFECTO DE LA HOMOCISTEÍNA A CONCENTRACIONES FISIOLÓGICAS Y DE HIPERHOMOCISTEINEMIA MODERADA EN PRESENCIA DE ESTRÉS OXIDATIVO.

Como se explicó en el apartado 3.2.2.3 de Materiales y Métodos, el modelo de estrés oxidativo (EO) se obtuvo añadiendo al medio de cultivo una combinación de xantina y xantina oxidasa (Xox) que genera ROS de forma crónica.

La inducción de EO en el cultivo pretende simular uno de los principales efectos del envejecimiento. El aumento de ROS en el medio celular mimetiza el EO que el organismo sufre en la vejez, por la disminución de su capacidad antioxidante. El efecto que los ROS desencadenan podría sensibilizar a la célula frente a estímulos débiles, como es el caso de la HHcy moderada. Por consiguiente, el modelo celular de la combinación de EO con Hcy, representaría el efecto de la Hcy en sujetos con niveles altos de ROS, como los que se dan en la vejez.

Igual que en el modelo celular para la Hcy, se fijó una curva de dosis de D,L-Hcy de 0 a 100 μ M con la que se trataron las células de forma simultánea a la xantina (10mM) + xantina oxidasa (50mU/ml)(Xox).

Posteriormente, se recogieron las muestras a los diferentes tiempos de tratamiento y se realizaron el estudio de la liberación de LDH y la medida de la proteólisis de PARP y de la fragmentación del ADN.

4.2.1 Estudio de la viabilidad celular en presencia de estrés oxidativo.

Para valorar el efecto de la Hcy en presencia de EO sobre la viabilidad celular empleamos el método de la liberación de LDH.

4.2.1.1 Estudio de la viabilidad celular mediante la liberación de LDH

Se realizó un estudio de la liberación de LDH a las 24, 36 y 48h de tratamiento (figura R-5) y con concentraciones de Hcy de 10 y 100 μ M, en presencia y ausencia de EO inducido por el tratamiento simultáneo con Xox.

A las 24h, en las concentraciones escogidas, no hay un descenso brusco de la viabilidad celular. Sólo la Xox produjo una ligera caída respecto al control que no es significativamente alterada por la Hcy (figura R-5).

A las 36h la viabilidad se mantuvo con la Hcy sola, en cambio la Xox, por sí misma, produjo un descenso de la viabilidad que tendió a restablecerse con el aumento de la concentración de Hcy, llegando, a concentraciones de HHcy moderada, a recuperarse en un 5% de forma estadísticamente significativa (figura R-5).

Si observamos la figura R-5, vemos que a las 48h, el tratamiento con Xox ha reducido la viabilidad por debajo del 50% y las concentraciones crecientes de Hcy, tal como se

Resultados

observó a 36h, promueven una recuperación parcial de la viabilidad. Así que, a la concentración de 100 μ M de Hcy (HHcy moderada) se recupera un 7% de la viabilidad de forma estadísticamente significativa.

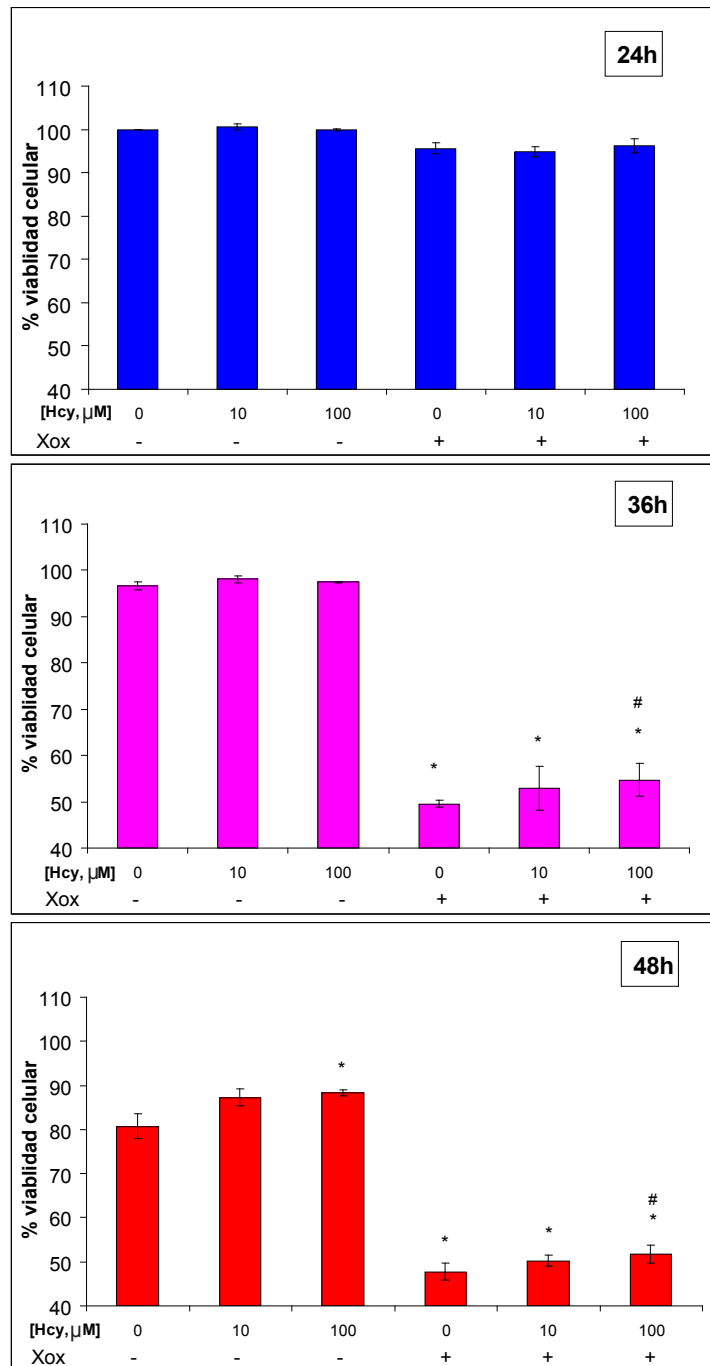


Figura R-5: Efecto de la Hcy sobre la viabilidad celular en ausencia y presencia de EO ((Hcy) y (Hcy + Xox), respectivamente). Estudio de la liberación de LDH a las 24h, 36h y 48h. Para inducir el EO se utilizó una concentración única de Xox (xantina 10 μ M + xantina oxidasa 50mU/ml). El asterisco indica diferencias significativas ($p<0.05$) respecto al control. La almohadilla indica diferencias significativas ($p<0.05$) respecto al tratamiento con Xox sola. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

4.2.2 Medida de la inducción de apoptosis

Para valorar el efecto de la Hcy en presencia de EO sobre la apoptosis celular empleamos dos técnicas: el estudio de la proteólisis de PARP y el estudio de la fragmentación del ADN.

4.2.2.1 Estudio de la inducción de apoptosis por efecto de la homocisteína en presencia de estrés oxidativo mediante la proteólisis de PARP

Siguiendo el patrón analítico de las muestras, se realizó el estudio de la proteólisis de PARP mediante western blot. Las medidas de D.O. de p85 se normalizaron con las medidas de D.O. obtenidas de la tubulina.

Para este análisis se realizó un estudio preliminar a las 36h con concentraciones de Hcy comprendidas entre 0 y 200 μ M.

En este estudio se pudo observar que la Xox por sí misma produjo un aumento de la proteólisis de PARP, que fue revirtiendo progresivamente con el aumento de la concentración de Hcy, llegando, en la concentración de 100 μ M de Hcy, y sobre todo en la de 200 μ M, a niveles basales de la señal de p85 (figura R-6a).

Resultados

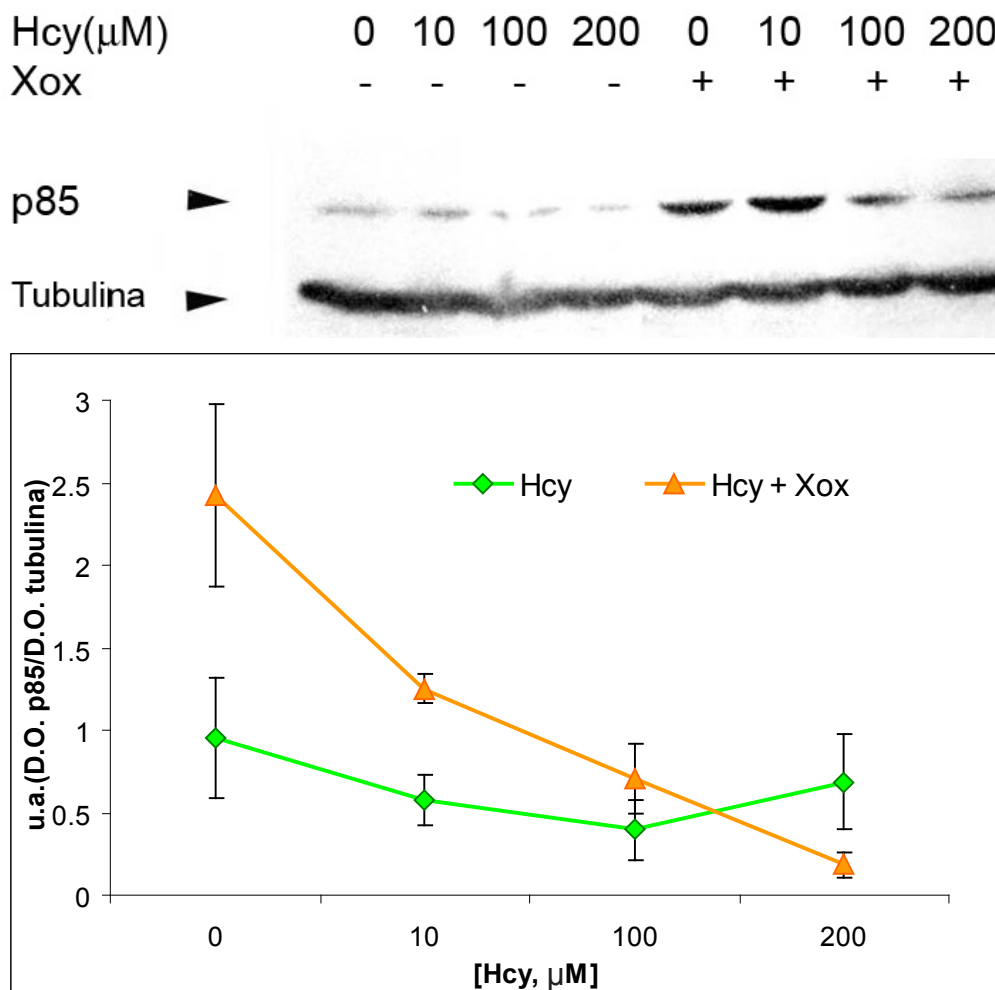


Figura R-6a: Efecto de la Hcy sobre la apoptosis en ausencia y presencia de EO ((Hcy) y (Hcy + Xox), respectivamente.) Estudio preliminar de la proteólisis de PARP a las 36h. Para inducir el EO se utilizó una concentración única de Xox (xantina 10 μ M + xantina oxidasa 50mU/ml). Las unidades arbitrarias (u.a.) corresponden a la densidad óptica de la señal de p85 normalizada por la densidad óptica de la tubulina. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

A continuación, ampliamos el análisis de la proteólisis de PARP a dos tiempos: 36 y 48h para observar si ese efecto se mantenía a tiempos más largos, utilizando el rango de 0 a 100 μ M de Hcy.

A las 36h (figura R-6b), las medidas normalizadas de p85 obtenidas revelaron que el

tratamiento de Xox por sí mismo provocaba un aumento de la cantidad del péptido p85, respecto al control sin tratar. Aumentando la concentración de la Hcy se producía una disminución de la proteólisis de PARP inducida por Xox, de forma estadísticamente significativa especialmente a 100 μ M. Este posible papel protector de la Hcy frente a la proteólisis de PARP se observó también, aunque no de forma significativa, en el tratamiento con Hcy sola, lo cual sugiere que en presencia de EO esa tendencia protectora se magnifica.

Sin embargo, a las 48h, la señal de p85 debida a la estimulación por Xox no varió su valor de forma significativa en ninguna de las concentraciones testadas de Hcy (figura R-6b), sugiriendo que a las 48h se pierde el efecto protector de la Hcy observado a las 36h

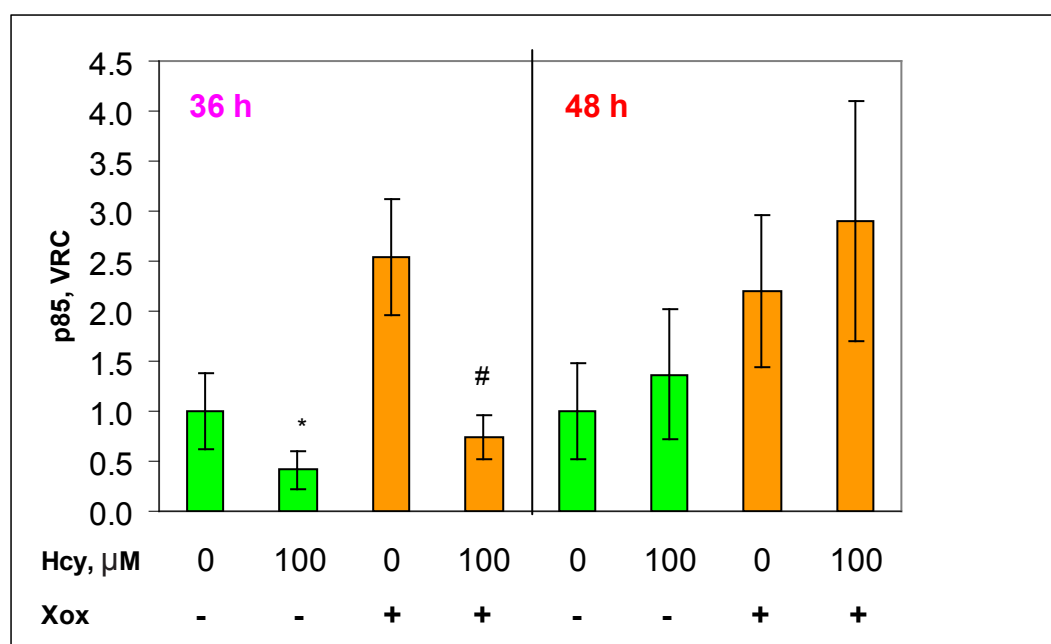


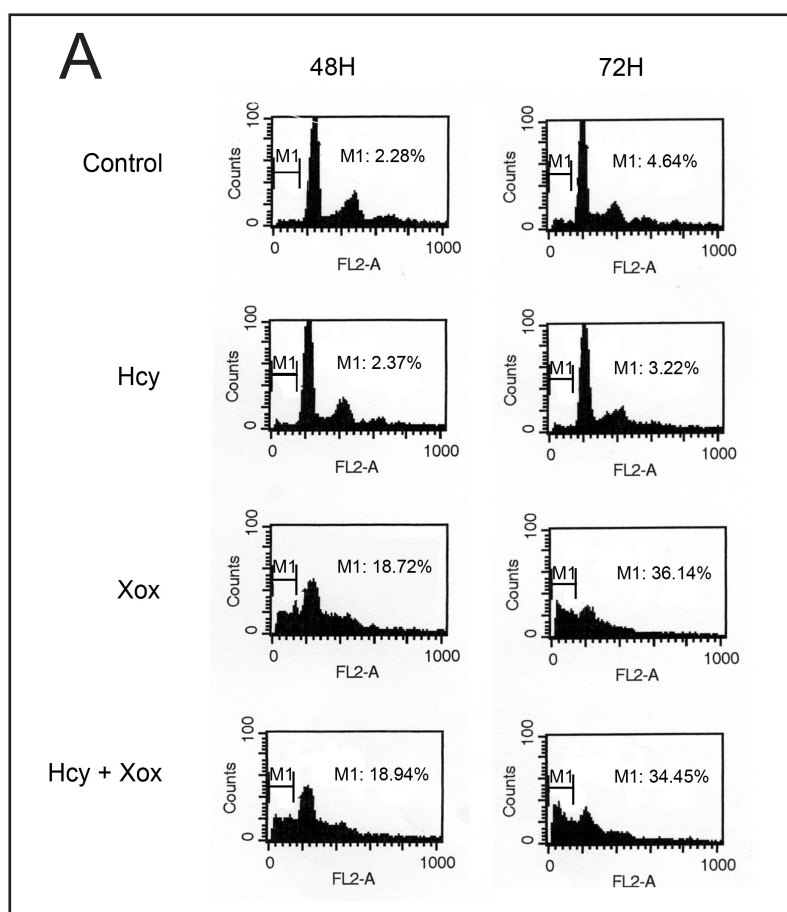
Figura R-6b: Efecto de la Hcy sobre la apoptosis en ausencia y presencia de EO ((Hcy) y (Hcy + Xox), respectivamente.) Estudio de la proteólisis de PARP a las 36h y 48h. Para inducir el EO se utilizó una concentración única de Xox (xantina 10 μ M + xantina oxidasa 50mU/ml). En cada tiempo, la señal de p85 se normalizó frente a su control (VRC). El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control. La almohadilla indica diferencias significativas respecto a la Xox sola. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

Resultados

4.2.2.2 Estudio de la inducción de apoptosis por efecto de la homocisteína en presencia de estrés oxidativo mediante la fragmentación del ADN.

La fragmentación del ADN, como marcador tardío de apoptosis, se determinó, a las 48h y 72h después del tratamiento, a concentraciones comprendidas en el rango de 0 a 100µM de Hcy.

Se observó a las 48h, igual que en el estudio de la proteólisis de PARP, que el tratamiento con Xox aumentaba de forma significativa la fragmentación de ADN respecto al control. El aumento de la concentración de Hcy por sí misma no alteró el nivel de fragmentación del ADN (Figura R-7).



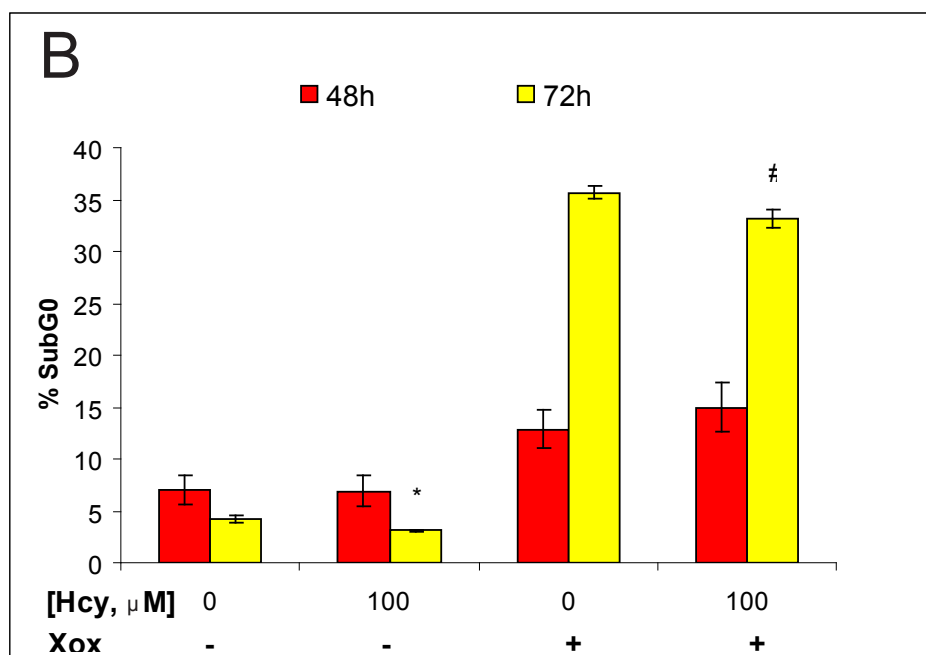


Figura R-7: Efecto de la Hcy sobre la apoptosis en ausencia y presencia de EO ((Hcy) y (Hcy + Xox), respectivamente). Estudio de la fragmentación de ADN a las 48h y 72h. En el panel A se muestra un experimento representativo y en el B la gráfica de la media de 5 experimentos. Para inducir el EO se utilizó una concentración única de Xox (xantina 10 μM + xantina oxidasa 50mU/ml). La fracción M1 corresponde con el porcentaje de células en SubG₀. EL asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control. La almohadilla indica diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al tratamiento con Xox sola. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

A las 72h, (figura R-7) el tratamiento con Xox elevó el porcentaje de células con el ADN fragmentado (células en subG₀) hasta más del 35%. Por otro lado, el efecto protector de la HHcy moderada frente al control, que se observaba con la proteólisis de PARP, se vuelve a reflejar en la fragmentación de ADN ya que hubo una reducción estadísticamente significativa de la mortalidad producida por el EO a las 72h.

Los resultados conjuntos de la proteólisis de PARP y la fragmentación del ADN sugieren que la Hcy no induce apoptosis de forma significativa a las concentraciones utilizadas y que es capaz de revertir la señal apoptótica inducida por Xox, al menos de forma transitoria.

4.3 EFECTO DE LA AUSENCIA DE FOLATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA MODERADA EN AUSENCIA Y EN PRESENCIA DE ESTRÉS OXIDATIVO.

El folato (vitamina B9) es un factor nutricional clave en el metabolismo de la Hcy. Su deficiencia en la dieta altera el funcionamiento del ciclo con su mismo nombre y provoca un aumento de la Hcy en sangre. Sin embargo, cuando el aporte de folato es suficiente disminuye la HHcy y sus efectos nocivos.

4.3.1 Estudio de la muerte por apoptosis bajo la ausencia de folato, en ausencia y en presencia de estrés oxidativo

Para valorar el efecto de la Hcy en presencia de EO sobre la apoptosis celular empleamos dos técnicas: el estudio de la proteólisis de PARP y el estudio de la fragmentación del ADN.

4.3.1.1. Estudio de la muerte por apoptosis mediante la proteólisis de PARP

Con objeto de estudiar el efecto de la HHcy moderada, mediante la proteólisis de PARP, en ausencia de folato se sometió el cultivo celular a una ausencia total de folato en el medio, frente a otro cultivo control, que disponía del medio MEM completo, tal y como se detalla en el apartado 3.2.2.1 de Materiales y Métodos. A ambos cultivos se les trató con Hcy y con la combinación de estímulos Xox y Hcy. Después de 48h se recogió el precipitado celular mediante raspado y se analizó, por medio de la técnica de western blot, la proteólisis de PARP (figura R-8). Tras 13 réplicas, repartidas en 4 experimentos distintos, se observó la tendencia a un aumento de la proteólisis de PARP (y posiblemente de la apoptosis) debido a la ausencia de folato, aunque esta tendencia no fue estadísticamente significativa.

En el caso del tratamiento con Hcy dicha tendencia se mantuvo y se magnificó, indicando que el efecto nocivo de la privación de folato se agravaba con la HHcy moderada.

Cuando las células fueron tratadas con Xox sola (modelo de EO), el efecto de la ausencia de folato sobre la proteólisis de PARP se elevó de forma significativa, aumentando más de dos veces respecto al mismo tratamiento (Xox) con folato.

En el caso del modelo celular de HHcy moderada en presencia de EO, en las muestras en ausencia de folato, se observa casi tres veces más proteólisis de PARP respecto a las muestras tratadas con el aporte adecuado de folato.

Así, el aumento de la proteólisis de PARP en ausencia de folato se acentúa al combinarse con el estrés oxidativo, siendo más alta la señal de p85 bajo el EO (estímulo fuerte) que con HHcy moderada (estímulo débil). La combinación de ambos estímulos sigue esa tendencia a magnificar la proteólisis de PARP. Ese aumento en la señal apoptótica inducido por la HHcy en presencia de EO es algo mayor, aunque ese aumento no llega a ser significativo, que el observado con la EO sólo.

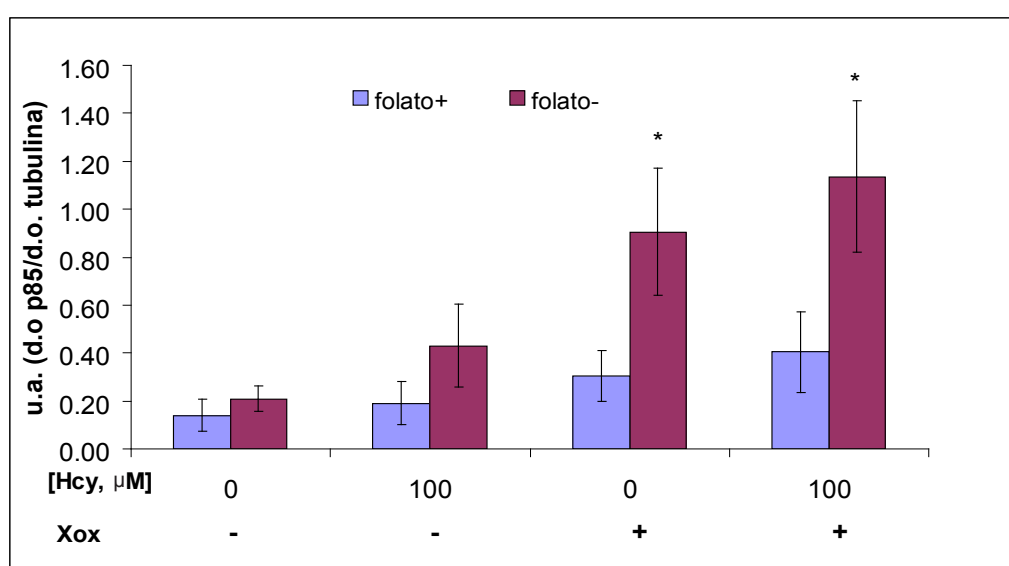


Figura R-8: Efecto de la Hcy sobre la apoptosis en ausencia de folato. Estudio de la proteólisis de PARP en ausencia y presencia de EO ((Hcy) y (Hcy + Xox), respectivamente.) a las 48h. Para inducir el EO se utilizó una concentración única de Xox (xantina 10 μM + xantina oxidasa 50mU/ml). Las unidades arbitrarias (u.a.) corresponden a densidad óptica de la señal de p85 normalizada por la densidad óptica de la tubulina. El asterisco indica una significatividad con un p-valor <0.05 de los tratamientos en ausencia de folato frente a ese mismo tratamiento con el aporte de folato adecuado. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

Resultados

4.3.1.2 Estudio de la muerte por apoptosis mediante la fragmentación del ADN.

Igual que en el caso anterior, se sometió el cultivo celular a una ausencia total de folato en el medio, frente a otro cultivo control, que disponía del medio MEM completo. A ambos cultivos se les trató con Hcy y con la combinación de estímulos Xox y Hcy. Se recogió el precipitado celular mediante raspado a las 48h y las 72h de tratamiento, se procesaron las muestras y se analizaron según el protocolo descrito en el apartado 3.5.2 de Materiales y Métodos.

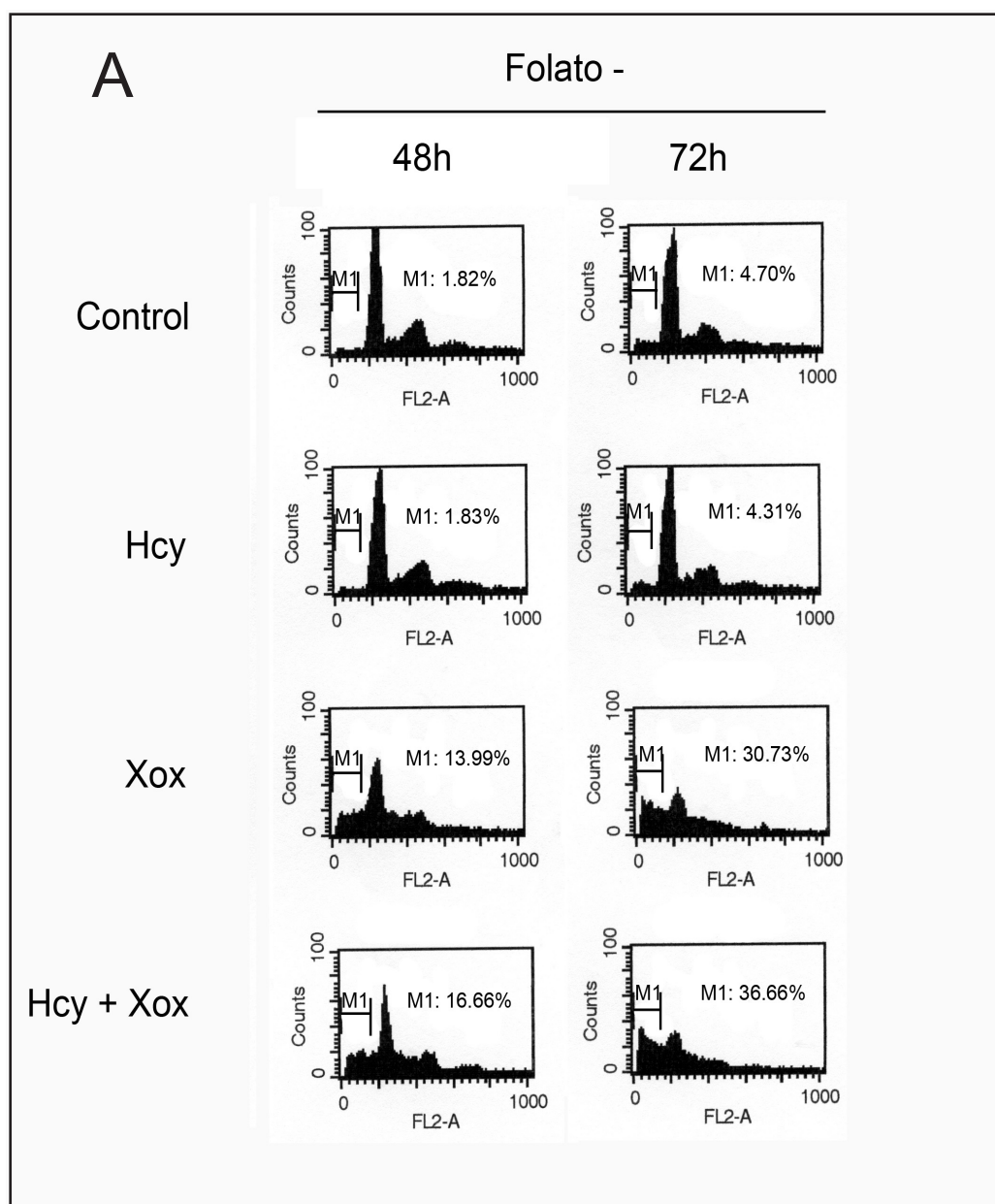
En la figura R-9, se muestran los resultados obtenidos de 9 réplicas realizadas a lo largo de 3 experimentos, de los cuales obtuvimos los siguientes resultados:

A las 48h (figura R-9), la HHcy moderada no produjo más porcentaje de células con el ADN fragmentado (células en subG₀) que el control, independientemente de la ausencia o la presencia de folato.

Tanto en el control como bajo HHcy moderada se ha observado una tendencia al aumento de la fragmentación del ADN debido a la ausencia de folato, pero no llega a ser estadísticamente significativa. En el modelo de EO (Xox) y en el de la HHcy moderada en presencia de EO (Hcy + Xox) observamos que el efecto de la ausencia de folato se hace más patente aumentando de forma significativa el porcentaje de células en subG₀ (aumento del 7% y el 12%, respectivamente) respecto a los mismos tratamientos con folato.

Centrándonos en la repercusión de la ausencia de folato sobre el efecto de la Hcy, encontramos un aumento del porcentaje de las células con el ADN fragmentado en el caso de la HHcy moderada en presencia de EO frente al modelo de EO (Xox) en ausencia de folato (figura R-9), cosa que no ocurría cuando el medio tenía un aporte de folato adecuado (figura R-6a y b). A diferencia de los resultados obtenidos con la proteólisis de PARP (apartado anterior, figura R-8), en el caso de la fragmentación del ADN, parece que la

HHcy moderada en combinación con el EO aumentó su toxicidad, en ausencia de folato, no solo respecto a la HHcy sola sino también al tratamiento con Xox (la combinación aumenta un 10% el número de células con ADN fragmentado respecto al estímulo de Xox sólo), resultando que la combinación de estímulos (HHcy moderada en presencia de EO) produce más fragmentación del ADN que los dos estímulos por separado, cuando no hay folato en el medio.



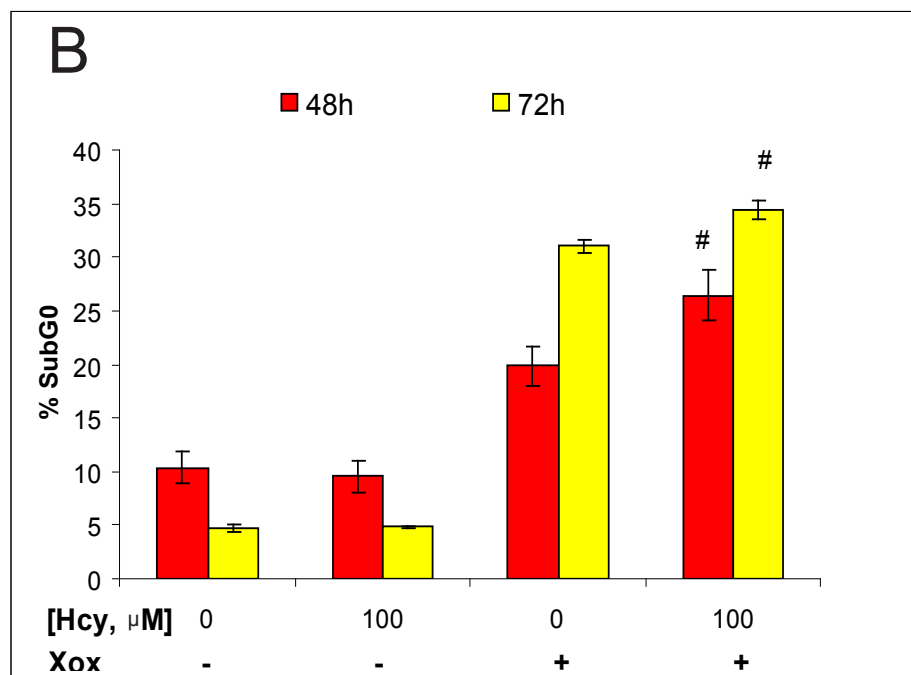


Figura R-9: Efecto de la Hcy sobre la apoptosis en ausencia de folato. Estudio de la fragmentación del ADN en ausencia y presencia de EO ((Hcy) y (Hcy + Xox), respectivamente.) a las 48h y 72h. En el panel A se muestra un experimento representativo y en el B la gráfica de la media de 5 experimentos. Para inducir el EO se utilizó una concentración única de Xox (xantina 10 μM + xantina oxidasa 50mU/ml). La fracción M1 corresponde con el porcentaje de células en SubG0. La almohadilla indica que el tratamiento combinado en ausencia de folato tiene una significatividad con un p-valor <0.05 respecto al tratamiento con Xox sola en ausencia de folato. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

A las 72h (figura R-9), mientras que en el control y en el tratamiento con HHcy sola no se presentan diferencias significativas entre la presencia o ausencia de folato, sí observamos que la HHcy en presencia de EO (Hcy + Xox) cambia su resultado final en ausencia de folato. Con el aporte adecuado de folato, la fragmentación del ADN disminuía en la combinación de estímulos, manifestándose el papel protector de la HHcy frente al EO (figura R-6). Sin embargo, en ausencia de folato, este papel protector de la HHcy moderada no solamente desaparece sino que se invierte. En ausencia de folato, la combinación de tratamientos produce significativamente más fragmentación del ADN (un 35% de las neuronas entraron en subG₀) que el EO por sí solo.

En resumen, los resultados sugieren que el folato juega un papel fundamental en la capacidad de la Hcy de modular la apoptosis inducida por EO en un modelo celular de neuronas humanas y que la HHcy moderada puede tener efectos protectores si el aporte de folato es adecuado, mientras que sería perjudicial en su ausencia.

4.4 ESTUDIO GENÓMICO DE LOS EFECTOS DE LA HOMOCISTEÍNA EN CÉLULAS NEURONALES HUMANAS EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE ESTRÉS OXIDATIVO.

Con el objetivo de reunir datos sobre los mecanismos de acción de la HHcy moderada en condiciones basales y de EO, partimos de los modelos celulares optimizados para el estudio del efecto de la HHcy moderada en presencia o ausencia de EO y realizamos un estudio genómico en dos vertientes. Por un lado, se realizó un análisis de la expresión génica diferencial mediante microarrays de ADN para los dos modelos estudiados: el de la HHcy moderada sola y el de la HHcy moderada en presencia de EO. Después, se realizó un estudio funcional, mediante minería de datos y enriquecimiento biológico, de los datos obtenidos de la expresión génica diferencial con las aplicaciones bioinformáticas Panther®, Genecodis y GSEA.

4.4.1. Estudio de la expresión génica diferencial mediante microarrays de ADN.

El tratamiento con Hcy, según la literatura, induce señales de EO y de ERE, excitotoxicidad e incluso señala muerte por apoptosis, entre otros efectos. Para analizar más concretamente cuales son los cambios producidos a nivel génico por efecto de la HHcy moderada y de la HHcy moderada en presencia de EO, a un tiempo de incubación de 18h, llevamos a cabo un estudio por medio de la tecnología de Microarrays de DNA (Human Genome Survey Microarray V2.0, Applied Biosystems).

Resultados

4.4.1.1 Estudio de la expresión génica inducida por la hiperhomocisteinemia moderada

Del análisis de la expresión génica que se realizó mediante microarrays de ADN y se procesó mediante la aplicación bioinformática Spotfire® obtuvimos que, de las 38878 sondas analizadas (correspondientes a 29098 genes), 58 genes se sobre expresaron con el tratamiento de HHcy respecto al control (H versus C) con un p-valor ≤ 0.05 . Estos genes se sobreexpresaron con un rango de 4.4 a 1.3 veces más por el efecto de la HHcy moderada que en el control. Tanto el número de genes que se sobre expresan como la magnitud de los cambios sugieren que la Hcy, a las concentraciones usadas, es un estímulo bastante suave para las células, en consonancia con los efectos leves observados en los estudios de viabilidad celular. En la tabla R-1 se detalla el listado de estos genes, indicando, para cada uno, las veces que se expresa respecto al control, la sonda correspondiente del microarray, el número de identificación de Entrez, el símbolo y el nombre del gen.

En las mismas circunstancias (H versus C, con un p-valor ≤ 0.05), se observaron 68 genes reprimidos por el tratamiento con Hcy. Estos genes se expresaban desde 4 a 1.3 veces menos por el efecto de la HHcy moderada que en el control. Igual que en el caso de los genes sobreexpresados, el efecto de la HHcy moderada en el modelo celular refleja un efecto suave tanto en la magnitud del cambio de expresión como en el número de genes modificados. El listado detallado de los genes reprimidos por efecto de la HHcy se muestra en la tabla R-2.

Tabla R-1: Genes sobreexpresados por la HHcy moderada (H vs C).

VRC	SONDA	GEN ID	SÍMBOLO	NOMBRE
4.44	155560			
4.00	131477	9598	CSAG2	Melanoma-associated antigen 12
3.61	234147			
3.61	227201	91584	PLXNA4B	Plexin-A4 precursor
3.51	232516			
3.10	143643	1673	DEFB4	Defensin, beta 4
2.93	210586			
2.93	129361	9123	SLC16A3	Solute carrier family 16, Member 3
2.91	127531			
2.81	181097	117289	TAGAP	T-cell activation GTPase activating protein
2.77	150602	374454	KRT1B	Keratin 77
2.77	408805			
2.71	108465	5099	PCDH7	Protocadherin-7 precursor (Brain-heart protocadherin)
2.64	186308			
2.57	121985			
2.55	118378	6915	TBXA2R	Thromboxane A2 receptor
2.53	158364	54753	DKFZp434J1015	Hypothetical protein DKFZp434J1015
2.48	192250			
2.38	184274			
2.30	142028	150159	LOC150159	
2.30	701322			
2.27	158873	26034	PIP3-E	Phosphoinositide-binding protein
2.19	223990	63973	NEUROG2	Neurogenin 2
2.17	140411	8988	HSPB3	Heat-shock protein beta-3
2.13	231071			
2.11	228150			
2.11	133640	84141	FLJ13391	
2.10	181480			
2.08	119012	11105	PRDM7	PR domain containing 7
2.08	198568		MRC1L1 MRC1	Mannose receptor, C type 1-like 1
2.08	689728	401445	LOC401445	
2.04	118372	5222	PGA5	Pepsinogen 5, group I
2.00	171364	440819	LOC440819	
1.99	231782			
1.96	184105			
1.95	154675			
1.93	150535	219670	C10orf63	Chromosome 10 open reading frame 63
1.92	191964		KRTAP1-3 KRTAP1-1	Keratin associated protein 1-3
1.87	222533	56101	PCDHGB5	Protocadherin gamma subfamily C, 3
1.83	226997	284756	FLJ33860	
1.78	232223			
1.72	138296			
1.69	145990	7041	TGFB11	Transforming growth factor beta 1 induced transcript 1
1.64	218678			
1.62	184129			
1.60	110418	10677	AVIL	Advillin
1.59	105061	22837	COBLL1	COBL-like 1
1.58	694201			
1.56	233586			
1.55	699545			
1.54	545793			
1.53	229551	283788	LOC283788	
1.53	139600	8287	USP9Y	Ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked
1.52	117006			
1.51	187106			
1.51	187792	55	ACPP	Acid phosphatase, prostate
1.43	110953	90678	LRSAM1	Leucine rich repeat and sterile alpha motif containing 1
1.28	177402			

Se muestra la sobreexpresión en veces respecto al control (VRC), la sonda correspondiente en el microarray, y el n° de identificación, símbolo y nombre del gen en Entrez (NCBI). $p < 0.05$.

Resultados

Tabla R-2: Genes reprimidos por la HHcy moderada (H vs C).

VRC	SONDA	GEN ID	SÍMBOLO	NOMBRE
4.00	210733			
3.78	179021	4208	MEF2C	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C
3.68	189916	390502	SERPINA2	serpin peptidase inhibitor, clade A , member 2
3.51	130933	58480	RHOU	ras homolog gene family, member U
3.36	132378	201477	LOC201477	
3.20	103054	326343	MTM	
3.07	150184	25876	C20orf28	chromosome 20 open reading frame 28
2.87	136086			
2.83	234658			
2.81	179723	169834	LOC169834	
2.73	116084			
2.71	150090	2880	GPX5	glutathione peroxidase 5 (epididymal androgen-related protein)
2.69	213603	55356	SLC22A15	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 15
2.66	166651	56961	SHD	Src homology 2 domain containing transforming protein D
2.53	166519		CKMT1B	creatine kinase, mitochondrial 1B creatine kinase, mitochondrial 1A
2.50	178353	4110	MAGEA11	melanoma antigen family A, 11
2.43	181953			
2.31	155395			
2.31	186266	5239	PGM5	phosphoglucomutase 5
2.30	177093			
2.27	230109			
2.22	179664			
2.13	230529			
2.10	102222			
2.08	207766			
2.04	148896	2589	GALNT1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide
2.01	170458	84807	TA-NFKBH	
2.00	208157	201651	LOC201651	
1.99	220343	150197	FLJ32575	
1.96	100458	55244	FLJ10847	
1.91	232400			
1.89	185875	90167	RP6-213H19.2	
1.89	147107	11081	KERA	keratocan
1.87	126179	7048	TGFBR2	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)
1.84	163898			
1.82	211774			
1.80	269469	164592	FLJ36046	
1.79	175404	57521	raptor	
1.75	170045	4335	MNT	MAX binding protein
1.72	143906	400794	LOC400794	
1.72	230331			
1.71	102754			

Tabla R-2: continuación.

VRC	SONDA	GEN ID	SÍMBOLO	NOMBRE
1.69	226721		LOC146177	
1.68	176036	84875	PARP10	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10
1.66	120762	5158	PDE6B	phosphodiesterase 6B, cGMP-specific, rod, beta
1.62	127249	51233	LOC51233	
1.62	221751	4047	LSS	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)
1.59	104533	79978	FLJ22814	
1.58	183103	51816	CECR1	cat eye syndrome chromosome region, candidate 1
1.57	229748			
1.56	134683	2117	ETV3	ets variant gene 3
1.55	111334	10319	LAMC3	laminin, gamma 3
1.54	135810	4034	LRCH4	leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 4
1.53	190012			
1.53	223197			
1.52	132049	79651	RHBDL6	rhomboid, veinlet-like 6 (Drosophila)
1.51	217525	149465	WDR65	WD repeat domain 65
1.49	126398			
1.48	226134			
1.48	122846	79927	GRRP1	glycine/arginine rich protein 1
1.48	621090	284009	LOC284009	
1.47	163842	9095	TBX19	T-box 19
1.42	167958	51402	LW-1	
1.38	146128			
1.38	212615		RPL19	ribosomal protein L19
1.37	148942	283663	LOC283663	
1.35	181563	80774	MGC10986	
1.34	147079	10312	TCIRG1	T-cell, immune regulator 1, ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 protein

Se muestra la inhibición en veces respecto al control (VRC), la sonda correspondiente en el microarray, y el n° de identificación, símbolo y nombre del gen en Entrez (NCBI). $p < 0.05$.

Resultados

Hay que señalar que los datos correspondientes a los genes obtenidos de la comparación H versus C (tanto sobreexpresados como reprimidos) no superan el p-valor para tests múltiples (ajustado por el método Benjamini-Hochberg) por lo que se hace necesario el abordaje desde otro ángulo: un estudio desde el punto de vista funcional, que se presenta en el apartado 4.4.2 de Resultados.

4.4.1.2 Estudio de la expresión génica inducida por la hiperhomocisteinemia moderada en presencia de estrés oxidativo

Para identificar los genes que modifican su expresión por el efecto de la HHcy moderada en presencia de EO, se estudió la expresión génica diferencial de las células tratadas con Hcy + Xox frente a las tratadas con Xox sola (XH versus X), así se determinó el efecto de la HHcy en presencia de estrés oxidativo, excluyendo los cambios producidos por el propio estrés oxidativo. De este análisis se obtuvo que de los 29098 genes analizados, superaron el p-valor ajustado ($p\text{-valor adj.} \leq 0.05$) 38 genes sobre expresados y 43 genes reprimidos en XH versus X. Así los genes detallados en las tablas R-3 y R-4 (genes sobreexpresados y reprimidos en la comparación XH versus X, respectivamente) son muy significativos ya que superan tanto el p-valor crudo como el p-valor ajustado por Benjamini-Hochberg para test múltiples.

Así, observamos que en la comparación XH versus X, además de ser sus datos más significativos que en la comparación H versus C, la magnitud del cambio de expresión génica también fue superior, llegando hasta valores de sobreexpresión de 6.8 veces más que con Xox sola, y a valores de represión de 4.6 veces.

Tabla R-3: Genes sobreexpresados por la HHcy moderada en presencia de EO (XH vs X).

VRX	SONDA	GEN ID	SÍMBOLO	NOMBRE
6.82	10715908			
6.68	343506	65267	WNK3	WNK lysine deficient protein kinase 3
6.61	235282			
6.32	160620	3250	HPR	haptoglobin-related protein
6.02	226807	390858	LOC390858	
5.95	235158	6480	ST6GAL1	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1
5.51	674650			
5.49	208221	343637	RSPO4	R-spondin family, member 4
5.47	197093			
5.44	187921	3662	IRF4	interferon regulatory factor 4
5.08	214264	3126	HLA-DRB4	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4
4.02	120188		LOC440547	
3.94	101570	9522	SCAMP1	secretory carrier membrane protein 1
3.93	182303	125704	C18orf51	chromosome 18 open reading frame 51
3.85	178845	57126	CD177	CD177 antigen
3.76	207426	391045	LOC391045	
3.75	102916	389114	ZNF662	zinc finger protein 662
3.67	152831	64064	OXCT2	3-oxoacid CoA transferase 2
3.63	188646			
3.55	211511	7133	TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
3.49	184380	6047	RNF4	ring finger protein 4
3.26	10322069			
2.96	189407			
2.91	140467			
2.83	224957			
2.83	227219			
2.81	10434918			
2.52	683836	6133	RPL9	ribosomal protein L9
2.42	192322			
2.35	132378	201477	LOC201477	
2.25	224249	163589	TDRD5	tudor domain containing 5
2.24	172316	4025	LPO	lactoperoxidase
2.15	127694	130271	PLEKHH2	pleckstrin homology domain containing, family H member 2
2.15	231387			
2.10	210392	6514	SLC2A2	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2
2.09	147635	441789	LOC441789	
2.02	206839	57282	SLC4A10	solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like, member 10
1.77	183384	8635	RNASET2	ribonuclease T2

Se muestra la sobreexpresión en veces respecto a la Xox (VRX), la sonda correspondiente en el microarray, y el n° de identificación, símbolo y nombre del gen en Entrez (NCBI). p ajustado <0.05 para test múltiples.

Resultados

Tabla R-4: Genes reprimidos la HHcy moderada en presencia de EO (XH vs X).

VRX	SONDA	GEN ID	SÍMBOLO	NOMBRE
4.66	141396	54103	LOC54103	
4.18	229445	151475	LOC151475	
4.15	114277	3113	HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1
4.07	102263	55540	IL17RB	interleukin 17 receptor B
4.07	235738	404266	LOC404266	
3.96	210399	117532	TMC2	transmembrane channel-like 2
3.77	170362	90850	ZNF598	zinc finger protein 598
3.55	202604	55125	CEP192	centrosomal protein 192kDa
3.34	143092	389025	LOC389025	
3.22	205919			
3.21	123028	144193	MGC35366	
3.20	180617	5727	PTCH	patched homolog (Drosophila)
3.12	235123	401431	LOC401431	
3.11	152077	8385	OR1D4	olfactory receptor, family 1, subfamily D, member 4
3.10	235163	158219	C9orf52	chromosome 9 open reading frame 52
3.10	234480			
3.10	196129	284001	LOC284001	
3.08	235277			
2.93	228517			
2.85	705612			
2.85	117987			
2.82	119269	5573	PRKAR1A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha
2.80	101688			
2.80	206836	96626	LIMS3	LIM and senescent cell antigen-like domains 3
2.67	707950			
2.66	222261			
2.64	233593			
2.56	233442			
2.41	234896	206338	FLJ90650	
2.40	220077	57512	GPR158	G protein-coupled receptor 158
2.39	188050	3791	KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
2.33	202656	4660	PPP1R12B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B
2.28	166553			
2.28	235500	773	CACNA1A	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit
2.27	218053			
2.22	230255	441300	LOC441300	
2.17	201475			
2.13	673253	375057	C1orf95	chromosome 1 open reading frame 95
2.09	107135	2241	FER	fer (fps/fes related) tyrosine kinase (phosphoprotein NCP94)
2.07	413036	283685	FLJ36144	
2.04	201523	26059	CAST1	
2.01	178123	5897	RAG2	recombination activating gene 2
1.96	122354	5174	PDZK1	PDZ domain containing 1

Se muestra la inhibición en veces respecto a la Xox (VRX), la sonda correspondiente en el microarray, y el n° de identificación, símbolo y nombre del gen en Entrez (NCBI). p ajustado <0.05 para test múltiples.

Desde una visión global, si tomamos los 300 primeros genes más significativos de entre todos los datos obtenidos de los arrays de HHcy, de Xox y de la combinación Hcy+Xox, frente al array control, comprobamos, mediante Spotfire®, que prácticamente dos tercios (196 genes) de estos genes coinciden en las comparaciones de arrays XH versus C y X versus C. El otro tercio del total (97, concretamente) son genes que solo aparecen en la comparación XH versus C. Sólo 2 genes (de los 300) coinciden entre la comparación H versus C y XH versus C. Por otro lado, si tomamos como referencia el conjunto H versus C, vemos que prácticamente la totalidad de los genes que lo conforman son genes propios y prácticamente no hay genes coincidentes con X versus C ni con XH versus C. De este diagrama se desprende que la HHcy en presencia de EO tiene una respuesta global bastante parecida a la del EO solo (comparten 196 genes), aunque con sus características propias (97 genes específicos) y es bastante distinta a la respuesta genómica producida por la HHcy moderada sola (con tan solo 2 genes compartidos). Además esta tendencia se mantiene, aproximadamente, por partes iguales tanto en los genes sobre expresados como en los reprimidos. (Figura R-10)

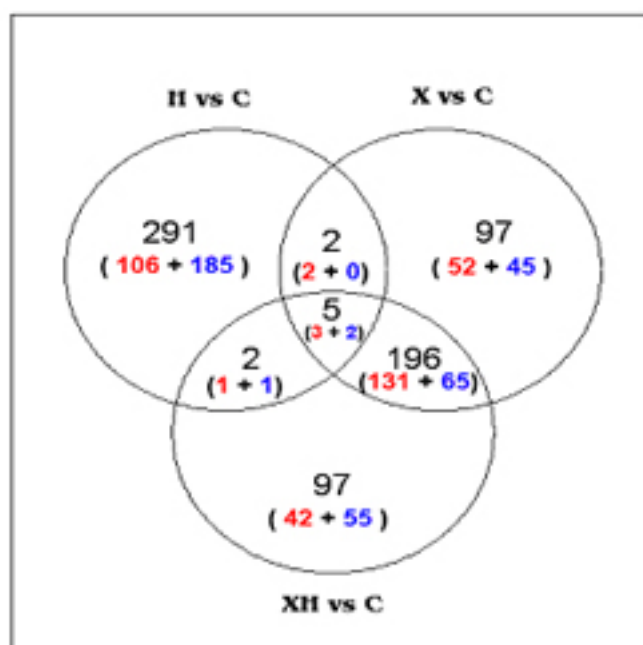


Figura R-10: Diagrama de Venn de los 300 genes más significativos de las comparaciones H vs C, X vs C y la comparación del array de la Hcy + Xox respecto al control (XH vs C). En rojo están los genes sobreexpresados y en azul los reprimidos para estas comparaciones.

Resultados

En la tabla R-5 se muestran cuáles son los genes coincidentes entre las diferentes combinaciones de arrays, incluyendo las combinaciones de 2 y 3 arrays a la vez. En esta tabla se han excluido los genes coincidentes X versus C con XH versus C debido a su elevado número. El estudio de los genes inducidos por Xox ha sido desarrollado por otro miembro del grupo [Vicente, 2007].

Tabla R-5: Relación de los genes coincidentes en el diagrama de Venn.

Expresión diferencial (VRC)			Sonda	Símbolo	Nombre
H	X	XH			
1.44	2.31	x	135137	ZNF292	zinc finger protein 292
1.39	1.68	x	220880	C18orf56	chromosome 18 open reading frame 56
1.51	x	1.74	510336	LOC388849	
1.62	x	1.79	221751	LSS	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)
1.62	2.19	2.06	110418	AVIL	advillin
1.53	3.07	3.36	199589	FER1L4	fer-1-like 4 (C. elegans)
1.29	2.10	2.00	129590	AMID	apoptosis-inducing factor (AIF)-like mitochondrion-associated inducer of death
1.27	2.36	2.27	161752	QPRT	quinolinate phosphoribosyltransferase (nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase) (carboxylating)
1.27	1.77	2.04	113573	MVK	mevalonate kinase (mevalonic aciduria)

Se muestra el nº de veces de sobreexpresión (en rojo) /represión (en azul) del gen respecto al control, el nº de sonda, su símbolo y su nombre completo. (x): el gen no ha sufrido cambios de expresión para ese tratamiento respecto al control.

4.4.2 Análisis funcional de los genes sobre expresados y reprimidos por la hiperhomocisteinemia moderada en ausencia y presencia de estrés oxidativo.

Además de hacer una clasificación de los genes en función de su grado de expresión, tal y como hemos descrito en el apartado anterior, también podemos hacerla por su función celular, mediante las aplicaciones bioinformáticas Panther® y Genecodis. Ambos programas clasifican grupos de genes usando la distribución de funciones asignada en la base de datos Gene Ontology (GO), aunque Genecodis, además, utiliza las bases de datos Interpro y Swissprot. Otro de los factores por el cual se han utilizado las dos aplicaciones es debido a que utilizan métodos estadísticos distintos, lo cual permite valorar la misma fuente genes de forma funcional desde dos ángulos diferentes.

Por último, los genes obtenidos de la comparación H versus C, los cuales no superaban la criba del p-valor ajustado, se han analizado también por una tercera aplicación bioinformática: GSEA (Gene Set Enrichment Análisis), la cual está especialmente diseñada, para extraer información de los datos de microarrays que a priori tienen poca fuerza estadística.

4.4.2.1 Análisis funcional mediante Panther®

Panther® utiliza un sistema de clasificación que nos permite analizar funcionalmente un grupo de genes desde tres campos distintos: las rutas metabólicas o de señalización, los procesos biológicos y las funciones moleculares en las que está implicado dicho grupo de genes. Realiza una comparación de los genes que se incluyen en nuestra lista respecto a lo esperado según la base de datos de Entrez para cada una de estas funciones. Por lo tanto, si hay más genes de los esperados en una determinada función en la lista, señala, junto con su significatividad estadística, de qué función se trata y qué genes de la lista proporcionada están implicados. El hecho de que haya más genes de lo esperado en la lista de interés comparada con la estimación de Entrez se indica como una tendencia positiva (+). Sin embargo, hay casos en los que en la lista de interés hay menos genes de

Resultados

una determinada función de lo esperado, entonces se marca como una tendencia negativa(-).

De los resultados obtenidos del estudio funcional con Panther® podemos deducir lo siguiente:

- Si analizamos la lista de los genes sobreexpresados en H versus C y hacemos un enriquecimiento de la categoría GO (tabla R-6), podemos ver que las rutas de señalización que destacan son las vinculadas a las interleukinas y a las cadherinas; los procesos biológicos relacionados tiene que ver, por un lado, con el desarrollo del ectodermo y la neurogénesis y, por otro lado, con la defensa e inmunidad. Las funciones moleculares observadas están, la mayoría directamente relacionadas con las rutas y los procesos biológicos antes citados. Sólo mencionar que la función molecular de unión a ácidos nucleicos tiene una tendencia negativa, lo cual indica que aunque hay dos genes representantes de esta función en la lista, son menos de los esperados, por lo cual se podría asumir que la unión a ácidos nucleicos, aunque se encuentre en la lista de los genes sobreexpresados, no está realmente sobreexpresada, sino más bien inhibida.

- En el caso de la lista de los genes reprimidos en H versus C (tabla R-7), nos encontramos que sólo hay una única ruta destacada, vinculada con la regulación del citoesqueleto por Rho-GTPasa; no hay ningún proceso biológico destacable y las funciones moleculares siguen una tónica similar a la de los genes sobreexpresados: vinculadas con el sistema nervioso (proteína mielina) y con el sistema inmune (receptores de citoquinas), además de la presencia de factores de transcripción.

Tabla R-6: Enriquecimiento funcional de los genes sobreexpresados por la HHcy moderada (H vs C) mediante Panther®.

Ruta metabólica/ señalización	Tend.	Sonda	Símbolo	Nombre
Ruta de señalización de interleukinas	+	118378	TBXA2R	thromboxane A2 receptor
		142028	LOC150159	Na ⁺ /H ⁺ exchanger like domain containing
		689728		
Ruta de señalización de cadherinas	+	108465	PCDH7	BH-protocadherin (brain-heart)
		222533	PCDHGB5	protocadherin gamma subfamily B, 5
Proceso biológico	Tend.	Sonda	Símbolo	Nombre
Desarrollo del ectodermo	+	227201	PLXNA4B	plexin A4, B
		150602	KRT1B	keratin 1B
		108465	PCDH7	BH-protocadherin (brain-heart)
		223990	NEUROG2	neurogenin 2
		105061	COBLL1	COBL-like 1
Defensa e inmunidad	+	143643	DEFB4	defensin, beta 4
		118378	TBXA2R	thromboxane A2 receptor
		140411	HSPB3	heat shock 27kDa protein 3
		198568	MRC1L1	mannose receptor, C type 1leucine rich repeat and sterile alpha motif containing 1
		110953		
Neurogénesis	+	184105		
		192250		
		227201	PLXNA4B	plexin A4, B
		108465	PCDH7	BH-protocadherin (brain-heart)
		223990	NEUROG2	neurogenin 2
		105061	COBLL1	COBL-like 1
Función molecular	Tend.	Sonda	Símbolo	Nombre
Otras fosfatasas	+	232223		
Inmunoglobulinas	+	187792	ACPP	acid phosphatase, prostate
		184105		
Cadherinas	+	108465	PCDH7	BH-protocadherin (brain-heart)
		222533	PCDHGB5	protocadherin gamma subfamily B, 5
Unión a ácidos nucleicos	-	158364	DKFZp434J1015	hypothetical protein DKFZp434J1015
		223990	NEUROG2	neurogenin 2
Proteínas de defensa e inmunidad	+	143643	DEFB4	defensin, beta 4
		184105		
		192250		
Filamentos intermedios	+	150602	KRT1B	keratin 1B
		191964	KRTAP1-3	keratin associated protein 1-1

Se detallan las rutas metabólicas, los procesos biológicos y las funciones moleculares destacadas. La tendencia (Tend.): (+) tendencia positiva, (-) tendencia negativa.

Resultados

Tabla R-7: Enriquecimiento funcional de los genes reprimidos por la HHcy moderada (H vs C) mediante Panther®.

Ruta metabólica/ señalización	Tend.	Sonda	Símbolo	Nombre
Regulación del citoesqueleto por Rho-GTPasa	+	130933 163898	RHOU	ras homolog gene family, member U
Proceso biológico	Tend.	Sonda	Símbolo	Nombre
Función molecular	Tend.	Sonda	Símbolo	Nombre
Otros factores de transcripción	+	167958 163842 179021	HSFX1 TBX19 MEF2C	heat shock transcription factor family, X linked 1 T-box 19 MADS box transcription enhancer factor 2 polypeptide C (myocyte enhancer factor 2C)
		134683	ETV3	ets variant gene 3
Proteína mielina	+	104533		
Otros receptores de citocinas	+	126179	TGFBR2	transforming growth factor, beta receptor II (70/80KDa)

Se detallan las rutas metabólicas, los procesos biológicos y las funciones moleculares destacadas. La tendencia (Tend.): (+) tendencia positiva, (-) tendencia negativa.

- Centrándonos ahora en la lista de genes sobreexpresados en la comparación XH versus X (tabla R-8) observamos que la expresión génica diferencial sigue dos grandes líneas: por un lado, los procesos biológicos relacionados con la circulación sanguínea, el transporte de carbohidratos y el intercambio de gases (que incluye además a los 2 genes más sobreexpresados) y, por otro, los relacionados con la defensa e inmunidad, igual que veíamos en el caso de los genes sobreexpresados en H versus C. Respecto a las funciones moleculares que se extraen de esta lista vemos que, además de las funciones directamente implicadas con los procesos biológicos antes mencionados, nos encontramos con funciones moleculares tales como nucleasas y endorribonucleasas. Además hay que destacar la presencia del gen del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) dentro del grupo de defensa e inmunidad, el cual se ha vinculado a los efectos proinflamatorios producidos por la Hcy [Dalal et al, 2003]

- Por último, analizamos la lista de los genes reprimidos en la comparación XH versus X (tabla R-9) y observamos que éstos están implicados en las rutas neurales relacionadas con los cannabinoides y el neurotransmisor glutamato, las cuales están directamente relacionadas con la excitotoxicidad atribuida a la HHcy. En cuanto a los procesos biológicos implicados vemos que afecta sobre todo a genes implicados en la modificación postraducciona de las proteínas y sin embargo, favorece (ya que hay menos genes de los esperados en la lista de los genes reprimidos) a los genes relacionados con el procesamiento génico (metabolismo de los ácidos nucleicos y transcripción).

Tabla R-8: Enriquecimiento funcional de los genes sobreexpresados por la HHcy moderada en presencia de EO (XH vs X) mediante Panther®.

Ruta metabólica/ señalización	Tend.	Sonda	Símbolo	Nombre
Proceso biológico	Tend.	Sonda	Símbolo	Nombre
Otros genes de actividad de intercambio de gases y circulación sanguínea	+	160620	HPR	haptoglobin-related protein
		343506	WNK3	WNK lysine deficient protein kinase 3
Transporte de carbohidratos	+	210392	SLC2A2	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), 2
		207426		
Circulación sanguínea e intercambio de gases	+	160620	HPR	haptoglobin-related protein
		343506	WNK3	WNK lysine deficient protein kinase 3
Defensa e inmunidad	+	160620	HPR	haptoglobin-related protein
		172316	LPO	lactoperoxidase
		214264	HLA-DRB4	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4
		187921	IRF4	interferon regulatory factor 4
		211511	TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
		147635		
Inmunidad mediada por MHCII	+	214264	HLA-DRB4	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4
Función molecular	Tend.	Sonda	Símbolo	Nombre
Transportador de carbohidratos	+	210392	SLC2A2	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), 2
		207426		
Proteínas de defensa e inmunidad	+	214264	HLA-DRB4	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4
		211511	TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
		197093		
Receptor de factor de necrosis tumoral	+	211511	TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
Nucleasas	+	224249	TDRD5	tudor domain containing 5
		183384	RNASET2	ribonuclease T2
Peroxidasas	+	172316	LPO	lactoperoxidase
Endoribonucleasas	+	183384	RNASET2	ribonuclease T2

Se detallan las rutas metabólicas, los procesos biológicos y las funciones moleculares destacadas. La tendencia (Tend.): (+) tendencia positiva, (-) tendencia negativa.

Resultados

Tabla R-9: Enriquecimiento funcional de los genes reprimidos por la HHcy moderada en presencia de EO (XH vs X) mediante Panther®.

Ruta metabólica/ señalización	Tend.	Sonda	Símbolo	Nombre
Señalización del receptor II GABA-B	+	119269	PRKAR1A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha
		235500	CACNA1A	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit
Ruta de señalización Hedgehog	+	119269	PRKAR1A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha
Ruta del receptor metabotrópico del glutamato grupo II	+	180617	PTCH1	patched homolog 1 (Drosophila)
		119269	PRKAR1A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha
		235500	CACNA1A	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit
Señalización endógena canabinoide	+	235500	CACNA1A	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit
Proceso biológico	Tend.	Sonda	Símbolo	Nombre
Fosforilación de proteínas	+	107135	FER	fer (fps/fes related) tyrosine kinase (phosphoprotein NCP94)
		188050	KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
		202656	PPP1R12B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B
		119269	PRKAR1A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha
Metabolismo de los ácidos nucleicos, nucleótidos y nucleósidos	-	178123	RAG2	recombination activating gene 2
Modificación proteica	+	119269	PRKAR1A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha
		107135	FER	fer (fps/fes related) tyrosine kinase (phosphoprotein NCP94)
		188050	KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
		202656	PPP1R12B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B
		170362	ZNF598	zinc finger protein 598
Transcripción de ARN mensajero	-	x		
Función molecular	Tend.	Sonda	Símbolo	Nombre
Receptor de proteína tirosina kinasa	+	188050	KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
		141396	LOC54103	hypothetical protein LOC54103
Receptor de proteína kinasa	+	188050	KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
		141396	LOC54103	hypothetical protein LOC54103
Factor de transcripción	-	x		
Endonucleasa	+	178123	RAG2	recombination activating gene 2
Canal de calcio dependiente de voltaje	+	235500	CACNA1A	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit
Proteína kinasa	+	107135	FER	fer (fps/fes related) tyrosine kinase (phosphoprotein NCP94)
		188050	KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
		141396	LOC54103	hypothetical protein LOC54103

Se detallan las rutas metabólicas, los procesos biológicos y las funciones moleculares destacadas. La tendencia (Tend.): (+) tendencia positiva, (-) tendencia negativa. ((x): No hay ningún gen de ese proceso biológico / función molecular).

4.4.2.2 Análisis funcional mediante Genecodis

Genecodis es una aplicación bioinformática on-line que, como Panther®, permite el análisis funcional de una determinada lista de genes. Ambas herramientas comparten prácticamente la misma base de datos, sin embargo Genecodis permite el análisis simultáneo del proceso biológico, función molecular y componente celular, lo cual nos sirve para definir mejor el proceso que se está modificando y de qué forma lo está haciendo.

- Analizamos los genes sobreexpresados para H versus C (tabla R-10) y observamos que el proceso biológico implicado (respuesta a estímulos abióticos) y la función molecular (unión a calcio) están directamente relacionadas con las cadherinas y la defensa e inmunidad a la que hacía referencia Panther®.

- Si estudiamos los genes reprimidos para H versus C (tabla R-11) vuelve a destacar la función molecular relacionada con la transcripción, afectando sobre todo a genes que codifican para proteínas que se localizan principalmente en el núcleo.

Tabla R-10: Enriquecimiento funcional de los genes sobreexpresados por la HHcy moderada (H vs C) mediante Genecodis.

Proc. Biológico/Func. Molecular/Comp. Celular	Gen ID	Símbolo	Nombre
Respuesta a estímulos abióticos (PB)	1673	DEFB4	defensin, beta 4
	8988	HSPB3	heat shock 27kDa protein 3
	9598	CSAG2	CSAG family, member 2
Unión a calcio (FM)	5099	PCDH7	BH-protocadherin (brain-heart)
	56101	PCDHGB5	protocadherin gamma subfamily B, 5
	10677	AVIL	advillin
	8287	USP9Y	ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked (fat facets-like, <i>Drosophila</i>)

Se detallan los procesos biológicos, el compartimento celular y las funciones moleculares destacadas. Se especifica el número de identificación Entrez, el símbolo y el nombre completo de cada gen.

Resultados

Tabla R-11: Enriquecimiento funcional de los genes reprimidos por la HHcy moderada (H vs C) mediante Genecodis.

Proc. Biológico/Func. Molecular/Comp. Celular	Gen ID	Símbolo	Nombre
Factor de transcripción (FM) / Núcleo (CC)	2117	ETV3	ets variant gene 3
	4335	MNT	MAX binding protein
	9095	TBX19	T-box 19
Regulador de la transcripción (FM)	4208	MEF2C	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C (myocyte enhancer factor 2C)

Se detallan los procesos biológicos, el compartimento celular y las funciones moleculares destacadas. Se especifica el número de identificación Entrez, el símbolo y el nombre completo de cada gen.

- En cuanto al listado de genes sobreexpresados en la comparación XH versus X (tabla R-12) vemos que se vuelve a replicar la función molecular de transporte así como muchos de los genes de defensa e inmunidad, que ahora vienen reflejados, en vez de por su proceso biológico, por su función molecular, que en este caso es de glicoproteína.

- Respecto a los genes reprimidos en XH versus X (tabla R-13), comprobamos que la función molecular de modificación de proteínas se repite, así como la presencia de un gran número de receptores que se encuentran en la membrana plasmática, alguno de los cuales coinciden con el proceso biológico de receptores metabotrópicos del glutamato, que se obtenía en el análisis con Panther®. Sin embargo, el análisis con Genecodis nos ofrece una información adicional: los genes de esta lista están implicados también en desarrollo y parte de ellos son proteínas integrales de membrana.

Tabla R-12: Enriquecimiento funcional de los genes sobreexpresados por la HHcy moderada en presencia de EO (XH vs X) mediante Genecodis.

Proc. Biológico/Func. Molecular/Comp. Celular	Gen ID	Símbolo	Nombre
Glicoproteína (FM)	3126	HLA-DRB4	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4
	4025	LPO	lactoperoxidase
	6514	SLC2A2	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2
	7133	TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
	8635	RNASET2	ribonuclease T2
Transporte (PB) / membrana (CC)	391045	LOC391045	
	9522	SCAMP1	secretory carrier membrane protein 1
	6514	SLC2A2	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2
Señalización (FM) "splicing" alternativo	3250	HPR	haptoglobin-related protein
	7133	TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
	8635	RNASET2	ribonuclease T2

Se detallan los procesos biológicos, el compartimento celular y las funciones moleculares destacadas. Se especifica el número de identificación Entrez, el símbolo y el nombre completo de cada gen.

Resultados

Tabla R-13: Enriquecimiento funcional de los genes reprimidos por la HHcy moderada en presencia de EO (XH vs X) mediante Genecodis.

Proc. Biológico/Func. Molecular/Comp. Celular	Gen ID	Símbolo	Nombre
Receptor (FM) / membrana plasmática (CC)	3791	KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
	55540	IL17RB	interleukin 17 receptor B
	5727	PTCH	patched homolog (Drosophila)
	3113	HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1
	8385	OR1D4	olfactory receptor, family 1, subfamily D, member 4
	57512	GPR158	G protein-coupled receptor 158
Desarrollo (PB)	26059	CAST1	
	5727	PTCH	patched homolog (Drosophila)
	773	LOC284001	
Transducción de señales (PB)	2241	FER	fer (fps/fes related) tyrosine kinase (phosphoprotein NCP94)
	3791	KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
	5727	PTCH	patched homolog (Drosophila)
	4660	PPP1R12B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B
Modificación de proteínas (PB)	5573	PRKAR1A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha
	3791	KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
	5727	PTCH	patched homolog (Drosophila)
	2241	FER	fer (fps/fes related) tyrosine kinase (phosphoprotein NCP94)
Proteína integral de membrana (CC)	117532	TMC2	transmembrane channel-like 2
	55540	IL17RB	interleukin 17 receptor B
	773	LOC284001	

Se detallan los procesos biológicos, el compartimento celular y las funciones moleculares destacadas. Se especifica el número de identificación Entrez, el símbolo y el nombre completo de cada gen.

Por consiguiente, si comparamos los resultados ofrecidos por Panther® y Genecodis, observamos, por un lado, que bastantes de los genes estudiados no se pudieron enriquecer con sus respectivas funciones biológicas, con ninguna de las dos aplicaciones, porque éstas todavía no están caracterizadas. Por otro lado, centrándonos en los genes que sí fueron anotados, encontramos bastantes genes coincidentes en sus resultados, lo cual afianza la información obtenida por estos métodos. La figura R-11 nos muestra el número de genes anotados por cada aplicación y el número de genes coincidentes en las dos anotaciones. De esta manera, comprobamos que la similitud entre los listados de genes anotados con cada uno de los métodos ronda desde un 22% en el caso de los genes sobreexpresados para H versus C, hasta más de la mitad de los genes anotados (coinciden el 54% de los genes anotados) en el caso de sobreexpresados en XH versus X.

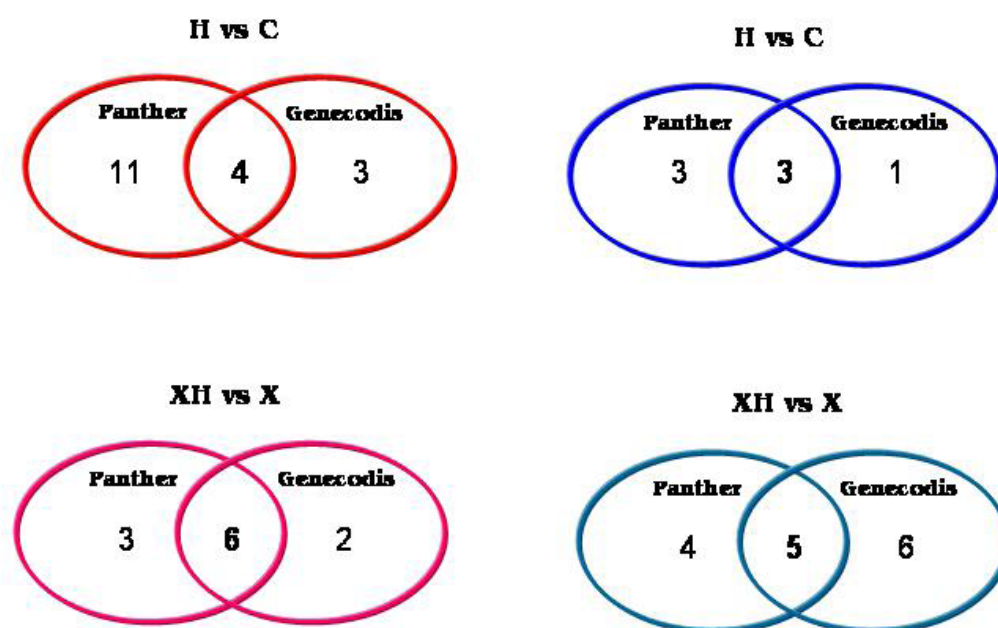


Figura R-11: Diagrama de Venn de Panther-Genecodis. Representa el número de genes coincidentes en los análisis funcionales con Panther® y Genecodis. En rojo y rosa están los genes sobreexpresados en (H vs C) y (XH vs X), respectivamente. En azul y verde están los genes reprimidos en las comparaciones (H vs C) y (XH vs X), respectivamente.

Resultados

De estos diagramas se desprende un listado de genes los cuales han pasado la criba de ambos métodos, y por lo tanto, las funciones vinculadas a ellos presentan una mayor credibilidad (Tabla R-14).

Tabla R-14: Listado de genes coincidentes en el diagrama de Venn de Panther-Genecodis.

Tratamiento	Sonda	Símbolo	Nombre
H vs C (sobrexpresados)	143643	DEFB4	defensin, beta 4
	140411	HSPB3	heat shock 27kDa protein 3
	108465	PCDH7	BH-protocadherin (brain-heart)
	222533	PCDHGB5	protocadherin gamma subfamily B, 5
H vs C (reprimidos)	134683	ETV3	ets variant gene 3
	179021	MEF2C	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C (myocyte enhancer factor 2C)
	163842	TBX19	T-box 19
XH vs X (sobrexpresados)	214264	HLA-DRB4	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4
	160620	HPR	haptoglobin-related protein
	172316	LPO	lactoperoxidase
	183384	RNASET2	ribonuclease T2
	210392	SLC2A2	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2
	211511	TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
XH vs X (reprimidos)	107135	FER	fer (fps/fes related) tyrosine kinase (phosphoprotein NCP94)
	188050	KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
	202656	PPP1R12B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B
	119269	PRKAR1A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha
	180617	PTCH1	patched homolog 1 (Drosophila)

En rojo y rosa están los genes sobreexpresados y en azul y verde, los reprimidos. Se especifica el tratamiento de donde han sido extraídos, el n° de sonda, el símbolo y el nombre completo de cada gen.

Estas funciones validadas por ambos métodos desde el punto de vista del enriquecimiento en la categoría GO, sugieren que la HHcy moderada modifica la expresión de los genes relacionados con la defensa e inmunidad, además de incrementar la expresión de los genes implicados en neurogénesis y reprimir a determinados factores de transcripción.

La HHcy moderada en presencia de EO incrementa la expresión de genes vinculados al transporte de gases y glucosa, reprime los genes implicados en excitotoxicidad y continúa modulando los genes implicados en defensa e inmunidad.

4.4.2.3 Análisis funcional mediante GSEA

GSEA es una herramienta bioinformática para el estudio funcional haciendo hincapié en los campos de función biológica, localización cromosómica y regulación. Esta aplicación está especialmente diseñada para casos como el de la comparación H versus C, en el que los datos no superan el umbral de la corrección por test múltiples, debido a que las diferencias biológicas son sutiles y se confunden con el ruido propio de la tecnología de los microarrays. Su potencia radica en la comparación de las listas de genes con 1325 grupos de genes; a diferencia de Panther® o Genecodis, su base de datos es la información publicada sobre las rutas bioquímicas o la coexpresión en otros experimentos. Por lo tanto, lo que hace es comparar la lista problema con estos grupos de genes y comprobar si los genes problema aparecen en estos grupos, especialmente si éstos aparecen en los grupos génicos de forma muy sobre expresada o muy inhibida.

En la tabla R-15, se muestra un listado de los grupos de genes que han resultado del análisis con GSEA de los datos del microarray procedentes de la comparación H versus C. En dicha tabla no se muestra ningún grupo de genes en el que aparezcan genes sobre expresados ya que ninguno superaba el umbral estadístico, no obstante sí obtuvimos una nutrida lista del grupo de genes reprimidos, entre los cuales se citan los más destacados.

Resultados

Tabla R-15: Análisis con GSEA de los genes reprimidos por la HHcy moderada (H vs C).

Ruta GSEA	Símbolo	Nombre
SIG_PIP3_SIGNALING_IN_CARDIAC_MYOCYTES	YWHAE	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib, alpha subunit 45kDa tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide
	INPPL1 RPS6KA1	inositol polyphosphate phosphatase-like 1 ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1
HDACI_COLON_TSA_DN	IGSF1 SC65 RNASE2	immunoglobulin superfamily, member 1 Synaptonemal complex protein SC65 Ribonuclease, RNase A family, 2 (liver, eosinophil-derived neurotoxin)
	XNF582 CLCN5	chloride channel 5 (nephrolithiasis 2, X-linked, Dent disease)
CMV_HCMV_TIMECOURSE_16HRS_UP	SLC7A1	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1
	SLC26A4	solute carrier family 26, member 4
AGUIRRE_PANCREAS_CHR7 TELPATHWAY	IGF1A BLC2 TERT	insulin-like growth factor 1 Apoptosis regulator Bcl-2 telomerase reverse transcriptase
	PPIC CXCL1	peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C) chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
CALRES_MOUSE_NEOCORTEX_UP TNFALPHA_ALL_UP	SNX12 COL6A2 CCK TMEM29 CYP26B1	sorting nexin 12 collagen, type VI, alpha 2 cholecystokinin transmembrane protein 29 cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1
	ZDHHC21 YWHAE	zinc finger, DHHC-type containing 21 platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib, alpha subunit 45kDa tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide
AGUIRRE_PANCREAS_CHR22	GGA1	golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 1
	MAP3K7IP1 KDELR3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 1 KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3
UVB_NHEK1_C1	COX7A2	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 like
	SEC61G ERCC2	Sec61 gamma subunit excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2 (xeroderma pigmentosum D)
AGUIRRE_PANCREAS_CHR1	MYF6 RPS21 CXC83 IL6 RPS6KA1	Myogenic factor 6 (herculin) ribosomal protein S21 interleukin 6 (interferon, beta 2) ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1

Tabla R-15: Continuación.

Ruta GSEA	Símbolo	Nombre
HEMATOPOESIS_RELATED_TRANSCRIPTION_FACTORS	NFE2	nuclear factor (erythroid-derived 2)
	HOXC6	homeobox C6
	CEBPE	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), epsilon
	PAX8	paired box gene 8
	HLX1	H2.0-like homeobox 1 (Drosophila)
	ELF1	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)
HASLINGER_B_CLL_17P13	TP53	tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)
NKTPATHWAY	RYR1	Ryanodine receptor 1 (skeletal)
	PLD2	phospholipase D2
	CXC83	
	IL4R	Interleukin 4 receptor
	CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2
	CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7
CHIARETTI_ZAP70_DIFF	IFNG	Interferon, gamma
	IL12RB2	interleukin 12 receptor, beta 2
	IL2	interleukin 2
	TGFB1	transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease)
	TGFB2	transforming growth factor, beta 2
	ITGA5	integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)
	GPR56	G protein-coupled receptor 56
	HPN	hepsin (transmembrane protease, serine 1)
	CTNND1	catenin (cadherin-associated protein), delta 1
	BBC3	BCL2 binding component 3
	E2F4	E2F transcription factor 4, p107/p130-binding
	TCF20	transcription factor 20 (AR1)
	PTPN18	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 18 (brain-derived)
	IL27RA	interleukin 27 receptor, alpha
PEART_HISTONE_UP	SPINK1	serine peptidase inhibitor, Kazal type 1
	TTN	titin
	PCSK7	proprotein convertase subtilisin/kexin type 7
	SLC2A1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1
AGUIRRE_PANCREAS_CHR19	LRRC15	leucine rich repeat containing 15
	IL32	interleukin 32
	SLC12A6	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 6
IGF1_NIH3T3_UP	FUT1	fucosyltransferase 1 (galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase)
	MYH3	myosin, heavy polypeptide 3, skeletal muscle, embryonic
	DAXX	death-associated protein 6
	MGP	matrix Gla protein
	NFE2L2	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
	RBM13	RNA binding motif protein 13
	ITGA5	integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)
	IL4R	Interleukin 4 receptor

Resultados

Tabla R-15: Continuación.

Ruta GSEA	Símbolo	Nombre
ASTIER_BCELL	ABCA4	ATP-binding cassette, sub-family A, member 4
	PART1	Prostate androgen-regulated transcript 1
	C19ORF29	chromosome 19 open reading frame 29
GUO_HEX_UP	CALM3	calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta)
	IGF1A	insulin-like growth factor 1
FATTY_ACID_METABOLISM	ADH1A	alcohol dehydrogenase 1A (class I), alpha polypeptide
	ACOX2	acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain
	CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
	ABCD2	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2
ASTIER_FN_DIFF	ABCA4	ATP-binding cassette, sub-family A, member 4
	PART1	Prostate androgen-regulated transcript 1
	C19ORF29	chromosome 19 open reading frame 29
UVB_NHEK4_6HRS_DN	IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)
	TGFB1	transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease)
	TGFB2	transforming growth factor, beta 2
	MAP3K14	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14
	KRT10	keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)
	DSC2	Desmocollin 2
	RARG	retinoic acid receptor, gamma
ARAPPATHWAY	KDEL3	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3
STRESS_IONIZING_SPECIFIC_UP	GGA1	golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 1
	INPPL1	inositol polyphosphate phosphatase-like 1
	RBL1	retinoblastoma-like 1 (p107)
AGUIRRE_PANCREAS_CHR12	LOC57228	
	OR7E47P	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 47 pseudogene
BRG1_ALAB_UP	TEC	tec protein tyrosine kinase
AS3_FIBRO_C3	ITGB5	integrin, beta 5
	TUBA3	
	TP53	tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)
	ZYX	zyxin

Se detallan las rutas metabólicas destacadas y los símbolos y los nombres completos de los genes que destacan en cada una de las rutas.

Otro dato importante a destacar del análisis con GSEA fue el obtenido de los grupos de genes que contenían tanto genes sobre expresados como reprimidos (rutas mixtas) de la lista problema H versus C. En este caso se encontraron 3 grupos de genes, los cuales están implicados en la vía de las caspasas y el sistema adrenérgico, principalmente. Estas rutas mixtas agruparon una gran cantidad de genes inhibidos en la lista problema, contrastando con sólo unos pocos sobre expresados, indicando una sutil regulación de esas rutas (tabla R-16).

Tabla R-16: Listado de rutas GSEA comunes en los listados de genes sobreexpresados y reprimidos por la HHcy moderada (H vs C).

Ruta GSEA	Genes sobreexpresados		Genes reprimidos	
	Símbolo	Nombre	Símbolo	Nombre
POMEROY_MD_TREATMENT_GOOD_VS_POOR_DN	RPL10A	ribosomal protein L10a	RPL27A	ribosomal protein L27a
			BYSL	bystin-like
			SNRPD2	small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide 16.5kDa
CASPASEPATHWAY	GXMB		CASP10	caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase
			PRF1	perforin 1 (pore forming protein)
			CASP2	caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 2)
			CASP9	caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
			CASP7	caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase
			ARHGDIB	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta
			LMNB1	lamin B1
ST_ADRENERGIC	ITPR2	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 2	LMNB2	lamin B2
			CCL13	chemokine (C-C motif) ligand 13
	SRC	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)	ITPR1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1
			CCL15	chemokine (C-C motif) ligand 15
			ITPR3	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3
			ASA1	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1
			BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
			PITX2	paired-like homeodomain transcription factor 2
			ITPKA	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A

Se detalla los genes pertenecientes al listado de los sobreexpresados o de los reprimidos de cada una de las rutas destacadas.

4.5 ASOCIACIÓN DE GENES RELEVANTES DEL CICLO DEL FOLATO CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Una de las vías más importante del metabolismo de la Hcy (y posiblemente la única que se da en el cerebro [McKeever et al, 1991; Finkelstein et al, 1998]) es la remetilación de la Hcy a metionina (Met). Ésta es posible gracias a un conjunto de enzimas, que junto con el folato (vitamina B9) y la vitamina B12, que actúan como cofactores, conforman el ciclo del folato. Por eso, es de crucial importancia el correcto funcionamiento de este ciclo para el mantenimiento de unos niveles normales de Hcy en sangre. Tal como se detalló en la introducción (apartado 1.2.1) las enzimas MTHFR y MTRR son dos enzimas clave del ciclo del folato, y cualquier mutación en los genes que codifican para estas enzimas es susceptible de alterar el equilibrio de la Hcy-Met en el organismo. Por esta razón decidimos realizar un estudio de los SNPs C677T y A1298C de la MTHFR y del A66G de la MTRR, los cuales además, se han vinculado según la bibliografía, con el cambio en los niveles de Hcy, con diversas enfermedades [Hobbs et al, 2000] e incluso con la EA [Bertram et al, 2007].

4.5.1 Estudio de asociación caso-control

Como se indica en el apartado 3.7 de Materiales y Métodos, se realizó un estudio de asociación genética (caso-control) con la EA con muestras de la población española del cual se desprendieron los siguientes resultados:

En la tabla R-17 se muestra la distribución genotípica de los tres polimorfismos estudiados en los casos y en los controles. Podemos observar que el hecho de ser portador del alelo C (genotipo CC + genotipo CT) del polimorfismo C677T de la MTHFR confiere casi el doble de riesgo de padecer EA, respecto a los no portadores (Riesgo relativo (Odds Ratio, O.R.): 1.9; p-valor: 0,009), mientras que los polimorfismos A1298C de la MTHFR y A66G de la MTRR no confieren ningún riesgo significativo por sí mismos.

Tabla R-17: Distribución de los genotipos de la MTHFR (677C/T), MTHFR (1298A/C) y MTRR (66A/G) en la muestra caso -control

Genotipo; n (frecuencia) ¹					
MTHFR(677)	CC	CT	TT	OR ² (95% CI)	p(χ ²)
Casos	69 (0.33)	109 (0.53)	28 (0.14)	1.9 (1.2-3.1)	0.009
Controles	102 (0.36)	116 (0.41)	65 (0.23)		
MTHFR(1298)					
	AA	AC	CC	1.5 (0.7-3.0)	ns
Casos	107 (0.52)	86 (0.42)	13 (0.06)		
Controles	140 (0.49)	117 (0.41)	26 (0.09)		
MTRR(66)					
	GG	GA	AA	1.3 (0.8-2.1)	ns
Casos	53 (0.29)	90 (0.50)	37 (0.21)		
Controles	56 (0.23)	123 (0.51)	61 (0.25)		

1. Número de muestras y, entre paréntesis, la frecuencia.

2. Riesgo para la EA. El riesgo relativo (odds ratio o OR) se calculó con el intervalo de confianza al 95% (95% CI) para (TC+CC) frente al genotipo TT del polimorfismo MTHFR677, para (AC+AA) frente al genotipo CC del polimorfismo MTHFR1298 y para (AG+GG) frente al genotipo AA del polimorfismo MTRR66, respectivamente.

4.5.2 Estudio de asociación del polimorfismo C677T estratificando por factores genéticos

Centrando el estudio en el polimorfismo C677T de la MTHFR, el siguiente paso consistió en su estudio estratificando la muestra por otros factores genéticos que pudiesen influir en el riesgo para la EA: por APOE y por los polimorfismos A1298C de la MTHFR y A66G de la MTRR.

En la tabla R-18, se recogen los datos obtenidos de la estratificación de la muestra en portadores y no portadores del alelo APOE4. Este estudio mostró que el riesgo de padecer EA aumenta hasta casi 4 veces en los portadores de C, que además son portadores del alelo APOE4 (O.R.:3.7; p-valor: 0.006), mientras que no se observa riesgo de los portadores de APOE4

Resultados

Tabla R-18: Distribución de los genotipos del SNP C677T de la MTHFR en la muestra caso-control, estratificada por el genotipo de APOE.

APOE4 ³	Genotipo MTHFR ¹			OR ² (95% CI)	p(χ^2)
	CC	CT	TT		
-/-					
Casos	35 (0.35)	45 (0.45)	19 (0.19)	1.2 (0.7-2.2)	ns
Controles	90 (0.37)	99 (0.41)	55 (0.23)		
-/+; +/+					
Casos	34 (0.32)	64 (0.60)	9 (0.08)	3.7 (1.4-10.1)	0.006
Controles	12 (0.31)	17 (0.44)	10 (0.26)		

1. Número de muestras y, entre paréntesis, la frecuencia.
2. Riesgo para la EA. El riesgo relativo (OR) se calculó con el intervalo de confianza al 95% (95% CI) para (TC+CC) frente al genotipo TT
3. Estratificación por APOE4: -/-, +/- y +++ implica ser portador de 0, 1 o 2 alelos APOE4, respectivamente.

Para comprobar si el genotipo del C677T de la MTHFR modulaba el riesgo debido a APOE4, el cual es un factor de riesgo muy fuerte para la EA, realizamos el estudio inverso: tomamos como factor de riesgo principal la presencia o la ausencia del alelo APOE4 en la muestra y estratificamos la muestra por el genotipo del polimorfismo C677T (tabla R-19). Observamos, que el riesgo de padecer la EA conferido por ser portador del alelo APOE4 frente a no serlo, aumenta también cuando el individuo es además portador del alelo C del polimorfismo C677T (OR:8 P: 8.3E-19), y es menor en lo no portadores (OR:2.6 , P: No significativo (NS)).

Estos resultados sugieren que los genes MTHFR y APOE podrían interactuar en alguna función que fuese relevante en relación con la EA.

Tabla R-19: Distribución del genotipo de APOE en la muestra caso-control general y estratificada por el genotipo del SNP C677T de la MTHFR.

MTHFR ⁴ (C677T)	GenotipoE4 ^{1,2}			OR ³ (95% CI)	p(χ ²)
	-/-	-/+	+/+		
<i>Todos</i>					
Casos	99 (0.48)	81 (0.39)	26 (0.13)	6.8 (4,4-10,5)	8.6E-20
Controles	244(0.86)	37 (0.13)	2 (0.01)		
<i>TT</i>					
Casos	19 (0.67)	6 (0.22)	3 (0.11)	2.6 (0,9-7,4)	ns
Controles	55 (0.85)	9 (0.14)	1 (0.02)		
<i>TC+CC</i>					
Casos	80 (0.45)	75 (0.42)	23 (0.13)	? 8.0 (5,1-13,1)	8.3E-19
Controles	189 (0.87)	28 (0.13)	1 (0.00)		

1. Número de muestras y, entre paréntesis, la frecuencia.
2. La leyenda del genotipo APOE4 esta en la tabla R-18.
3. Riesgo para la EA. El riesgo relativo (OR) se calculó con el intervalo de confianza al 95% (95% CI) para ((-/+) + (+/+)) frente al genotipo -/-.
4. Estratificación por el genotipo del polimorfismo MTHFR677

- La estratificación de la muestra por el polimorfismo A1298C de la MTHFR (tabla R-20) dio como resultado que los portadores del alelo C para C677T, en individuos con el genotipo AA para el polimorfismo A1298C, tienen un riesgo más alto para la EA (O.R.: 2.4; p-valor: 0.001) mientras que no había riesgo asociado al genotipo C677T en los individuos portadores del alelo 1298C, sugiriendo que ambos polimorfismos de la MTHFR son relevantes en relación con la EA.

Resultados

Tabla R-20: Distribución de los genotipos del SNP C677T de la MTHFR en la muestra caso-control, estratificada por el genotipo del SNP A1298C de la MTHFR.

MTHFR³ A1298C	Genotipo MTHFR 677C/T¹			OR² (95% CI)	p(χ^2)
	CC	CT	TT		
<i>A/A</i>					
Casos	27 (0.25)	56 (0.52)	24 (0.22)	2.4 (1.4-4.3)	0.001
Controles	27 (0.19)	55 (0.39)	58 (0.41)		
<i>A/C;C/C</i>					
Casos	42 (0.42)	53 (0.54)	4 (0.04)	1.2 (0.3-4.3)	ns
Controles	75 (0.52)	61 (0.43)	7 (0.05)		

1. Número de muestras y, entre paréntesis, la frecuencia.
2. Riesgo para la EA. El riesgo relativo (OR) se calculó con el intervalo de confianza al 95% (95% CI) para (TC+CC) frente al genotipo TT
3. Estratificación por el genotipo del polimorfismo MTHFR1298.

- No se observan interacciones significativas entre los polimorfismos C677T de la MTHFR y el A66G de la MTRR.

4.5.2.1 Estudio haplotípico de los polimorfismos C677T y A1298C de la MTHFR

El análisis haplotípico nos permite valorar de manera más integrada el riesgo que confieren los polimorfismos que lo conforman ante una determinada enfermedad.

Teniendo en cuenta los resultados mencionados arriba, estudiamos los haplotipos correspondientes a los polimorfismos C677T y A1298C de la MTHFR (tabla R-21). De este estudio obtenemos que el haplotipo C677-A1298 confería riesgo para la EA frente al resto de haplotipos para estos polimorfismos.

Tabla R-21: Distribución de los haplotipos de la MTHFR (677C/T y 1298A/C) en la muestra caso-control general y estratificada por APOE.

	Haplotipo MTHFR 677C/T y 1298A/C ¹					
APOE4 ³	C677-A1298	C677-1298C	677T-A1298	677T-1298C	OR ² (95% CI)	p(χ ²)
<i>Todos</i>						
Casos	159.0(0.36)	103.0(0.23)	159.0(0.36)	15.0(0.03)	1.4 (1.0-2.0)	0.02
Controles	166.4(0.29)	155.6(0.27)	232.6(0.41)	13.4(0.02)		
<i>-/-</i>						
Casos	51.1(0.29)	44.9(0.26)	71.9(0.41)	6(0.03)	1.2 (0.6-2.3)	ns
Controles	117.5(0.28)	120.5(0.29)	165.6(0.40)	15.5(0.02)		
<i>-/+; +/+</i>						
Casos	90.2(0.40)	47.8(0.21)	73.8(0.33)	10.2(0.05)	1.7 (0.8-3.5)	ns
Controles	21.5(0.27)	19.5(0.25)	35.5(0.45)	1.5(0.02)		

1. Número de haplotipos estimados y, entre paréntesis, la frecuencia relativa de los haplotipos.
2. Riesgo para la EA. El riesgo relativo (OR) se calculó el intervalo de confianza al 95% (95% CI) para (C677-A1298) frente al resto.
3. ApoE4 La leyenda del genotipo APOE4 esta en la tabla R-18.

Sin embargo, si el haplotipo C677-A1298, se estratifica por la APOE (presencia o ausencia del alelo APOE4), observamos que aumenta el riesgo para la EA con los portadores del alelo APOE4 frente al resto, pero éste no es significativo debido al bajo número de muestras control portadoras del alelo APOE4. De forma similar al polimorfismo C677T de MTHFR, el riesgo es significativo en portadores del alelo APOE4, y no lo es en los no portadores.

4.5.3 Estudio de asociación del polimorfismo C677T estratificando por factores no genéticos

Los principales factores no genéticos vinculados a la EA son la edad y el sexo. Por lo tanto, se estratificó la muestra por estos factores:

- Respecto a la edad, se dividió la muestra en 2 grupos: el primero comprendía a las muestras de pacientes con inicio de la EA de entre 45 y 59 años (en las muestras caso) y

Resultados

la segunda a las muestras de pacientes con inicio de la EA con 60 años o más. En el caso de las muestras control se tomo como referencia la edad del paciente en la fecha de la recogida de la muestra para separarlos en estos dos grupos de edad. La estratificación de la muestra por la edad, en el estudio del SNP C677T, mostró que los dos grupos presentaban un riesgo similar por lo que no hay interacción con la edad.

- En cuanto a la estratificación por el sexo (tabla R-22) observamos que los individuos varones que además son portadores del alelo C frente a los no portadores tienen un riesgo para la EA de (O.R.: 2.9; p-valor: 0.012) cosa que no sucede en el caso de las mujeres portadoras del alelo C, en las cuales el riesgo se diluye y pierde la significatividad.

Tabla R-22 Distribución de los genotipos del SNP C677T de la MTHFR en la muestra caso-control, estratificada por el sexo.

	Genotipo MTHFR 677C/T ¹				
Sexo ³	CC	CT	TT	OR ² (95% CI)	p(χ ²)
HOMBRES					
Casos	23 (0.32)	41 (0.57)	8 (0.11)	2.9 (1.2-6.6)	0.012
Controles	45 (0.39)	39 (0.34)	30 (0.26)		
MUJERES					
Casos	46 (0.34)	68 (0.51)	20 (0.15)	1.5 (0.8-2.7)	ns
Controles	57 (0.34)	77 (0.46)	35 (0.21)		

1. Número de muestras y, entre paréntesis, la frecuencia.
2. Riesgo para la EA. El riesgo relativo (OR) se calculó con el intervalo de confianza al 95% (95% CI) para (TC+CC) frente al genotipo TT
3. Estratificación por el sexo de los pacientes.

Por último, si tenemos en cuenta todos los factores que han modulado el riesgo del alelo C de C677T (presencia del alelo APOE4, del genotipo AA del polimorfismo A1298C y el sexo masculino), observamos que en este grupo de población el riesgo se eleva hasta casi 9 veces (O.R.: 8.9; p-valor: 0.015) (figura R-12).

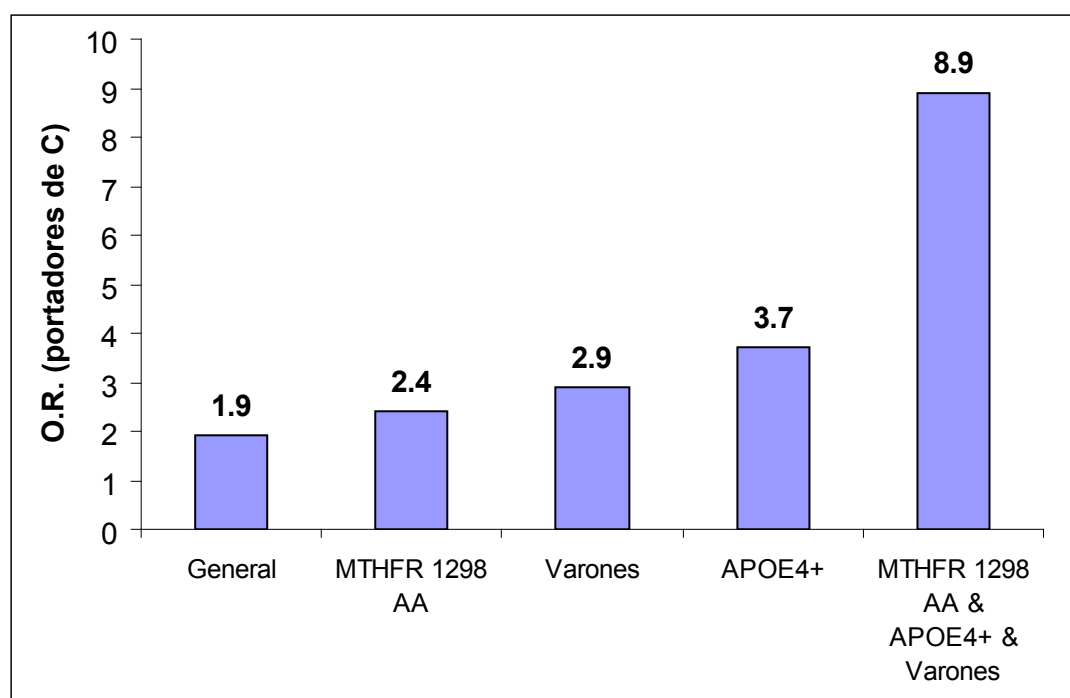


Figura R-12: Resumen del riesgo para la EA asociado al polimorfismo C677T de la MTHFR.

Discusión

5.1 EFECTO DE LA HOMOCISTEÍNA EN LA VIABILIDAD Y LA MUERTE APOPTÓTICA DE LAS CÉLULAS SK-N-MC.

Tras el análisis de los efectos producidos por la Hcy en el modelo celular de neuroblastoma SK-N-MC, podemos inferir que la Hcy, a concentraciones que abarcan el rango desde concentraciones fisiológicas hasta la HHcy moderada es un estímulo débil. Dentro de este rango la Hcy, tal como indicó la liberación de LDH, no produce muerte celular, sino más bien resulta un factor protector a tiempos largos (48h). Esto podría ser debido a que la Hcy, a dichas concentraciones, no es suficiente como para inducir la ruptura de la membrana celular y así, liberar la enzima LDH, siempre y cuando la célula tenga el adecuado aporte de nutrientes. Es más, a tiempos largos (48h) cuando ciertos nutrientes empiezan a escasear en el medio, el aminoácido Hcy podría servir de apoyo nutricional, contribuyendo al aumento de la supervivencia celular. Por otra parte, el incremento de la señal de MTT se podría atribuir a que la Hcy incrementa el metabolismo mitocondrial aumentando la señal de éste marcador y enmascarando su posible efecto sobre la mortalidad celular [Tyagi et al, 2005].

En resumen, nuestros resultados sobre viabilidad celular sugieren que la Hcy a concentraciones iguales o inferiores a 100 μ M, actúa contribuyendo positivamente a la viabilidad del cultivo, en particular aumentando la actividad de las enzimas redox mitocondriales, lo que contribuiría a aumentar la capacidad reductora de las células. Si esta observación fuera cierta, debería apreciarse una alta capacidad de la Hcy para proteger a las células frente al EO, tema que discutiremos en el siguiente apartado.

En cuanto al efecto de la Hcy sobre la muerte celular por apoptosis lo estudiamos a dos niveles: primero, a nivel de la proteólisis de PARP, midiendo la señal, vía western blot, del fragmento p85, que es un indicador de la activación de la cascada de las caspasas [Kauppinen et al, 2007] y por lo tanto, un marcador intermedio en la serie de acontecimientos

Discusión

producidos en la apoptosis. La activación de PARP envía una señal a las mitocondrias que liberan el factor inductor de apoptosis (AIF), el cual se transloca al núcleo induciendo la fragmentación del ADN a gran escala y la condensación de la cromatina [Hong et al, 2004]. El segundo nivel de estudio de la muerte celular por apoptosis es, precisamente, a nivel de la condensación y fragmentación del ADN, uno de los últimos estadios apoptóticos [Krantic et al, 2007].

Tras el seguimiento de estos marcadores pudimos observar que hasta las 36h de tratamiento con Hcy no se producía la proteólisis de PARP, pero a las 36h ya había una señal apreciable de p85 en los cultivos control; sin embargo, se observó una tendencia a disminuir la señal apoptótica directamente proporcional a la concentración de Hcy, que se perdió a las 48h. Estos resultados muestran que a concentraciones de Hcy comprendidas desde el rango fisiológico a la HHcy moderada no se produce una activación de la vía apoptótica de PARP por efecto de la Hcy.

Atendiendo a la fragmentación del ADN, el tratamiento con Hcy no produjo cambios apreciables a las 48h respecto al control (figura R-4b), solamente a las 72h se registró una ligera recuperación de la supervivencia celular por efecto de la HHcy moderada, tal como se observó en la prueba de la liberación de la LDH. Este resultado contrasta con la hipótesis que explicaba que la Hcy promovía la apoptosis a través a la rotura del ADN debido a una inadecuada metilación [Mattson et al, 2003; Sachdev et al, 2005]. Las discrepancias con la información bibliográfica citada se deben, probablemente, a la diferencia de las concentraciones de uso de la Hcy, ya que en la mayoría de la bibliografía se utilizan concentraciones de Hcy muy superiores (incluso del orden de 100 veces superior al rango fisiológico) a las empleadas en este trabajo. Así, sin contradecir directamente lo expuesto en la literatura, podemos afirmar que, a las concentraciones de Hcy comprendidas entre 10 μ M y 100 μ M, no se produce fragmentación ADN de manera apreciable en un modelo de neuronas humanas.

Todo indica que la Hcy a las concentraciones estudiadas, no tiene capacidad para activar la vía apoptótica de PARP. La HHcy moderada produce una tendencia a disminuir la señal de p85 a tiempos medios (36h) que después se hace patente mediante la fragmentación del ADN (marcador tardío de apoptosis) a tiempos largos (72h) sugiriendo un papel protector de la Hcy frente a la apoptosis.

Este fenómeno protector de la Hcy observado en el modelo del neuroblastoma SK-N-MC, fue descrito también en la bibliografía [Buemi et al, 2001], por lo que se concluye que el efecto producido por la Hcy a concentraciones comprendidas dentro del rango fisiológico y de la HHcy moderada se decantan más por promover la supervivencia celular que por inducir apoptosis.

5.2 EFECTO DE LA HOMOCISTEÍNA EN LA VIABILIDAD Y LA MUERTE APOPTÓTICA EN PRESENCIA DE ESTRÉS OXIDATIVO.

El modelo de EO mediante el tratamiento con Xox permite un aumento constante de los niveles celulares de ROS, los cuales mimetizan perfectamente el EO crónico asociado al envejecimiento. En primer lugar, comprobamos que el EO tenía un papel sobre la viabilidad celular muy acusado en comparación con la Hcy. Esto se reflejó en la caída de la viabilidad a partir de las 36h medida por la liberación de la LDH, por efecto del EO exclusivamente.

En estas circunstancias, en la cuales las células están sensibilizadas, las concentraciones crecientes de Hcy, lejos de incrementar la toxicidad de la Xox, produjeron cierta recuperación de la viabilidad celular medida por liberación de LDH. Este efecto apreciable a las 36h y patente a las 48h resulta coherente con el efecto sobre la viabilidad comentado en el apartado anterior. Parece que la Hcy por sí misma produce un efecto protector celular, de tal manera que las células incrementan su supervivencia con la Hcy revirtiendo, en parte, los efectos nocivos producidos por el EO, posiblemente debido al incremento de la actividad reductora celular.

Discusión

En cuanto a los marcadores apoptóticos, también se reveló un aumento de la proteólisis de PARP por efecto exclusivo del EO (figura R-6a). Sin embargo, a las 36h, la señal de p85 producida por el EO fue significativamente reducida por efecto de la HHcy moderada, mientras que a las 48h se pierde el efecto protector. Estos resultados se ven respaldados por los obtenidos de la fragmentación del ADN, ya que el EO indujo un aumento de la fragmentación del ADN a las 48h y, sobre todo, a las 72h, que se revirtió parcialmente por efecto de la HHcy moderada a las 72h. Esta observación nos permite hacernos una idea del tiempo que pasa entre uno y otro fenómeno de la cascada apoptótica en nuestro modelo. En el caso de la proteólisis de PARP, se observó el pico de protección de la Hcy a las 36h el cual se replicó, en la fragmentación del ADN, a las 72h.

De estos resultados se deduce que el EO producido por la Xox genera una señal apoptótica además de otros daños, como disrupción de la membrana y liberación del contenido citoplasmático al medio. El EO producido por la Xox es capaz de arrestar el ciclo celular y, a la larga, inducir la muerte celular por apoptosis [Vicente, 2007].

En contraste, podemos deducir que la Hcy, a las concentraciones estudiadas, tiene un papel antioxidante probablemente contrarrestando la generación de ROS, por su capacidad de regular la producción del NO [Upchurch et al, 1997b], el ácido lipoico RS- α [Lockhart et al, 2000] y la melatonina [Baydas et al, 2003]. Además, los resultados obtenidos corroboran la observación de que la Hcy parece aumentar el poder reductor celular y no hay ninguna evidencia en nuestros datos de que la Hcy induzca estrés o muerte celular por apoptosis en ausencia o en presencia de EO.

5.3 EFECTO DE LA AUSENCIA DE FOLATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA MODERADA EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE ESTRÉS OXIDATIVO.

Hemos comprobado, a través de los resultados obtenidos, que la HHcy moderada en presencia de EO juega un papel protector frente al daño producido por el EO, mejorando la viabilidad celular de forma global. Este mismo efecto protector se observó, aunque de forma más sutil tras la inducción de HHcy en ausencia de EO. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el modelo celular estudiado estaba suplementado con un aporte vitamínico óptimo. Niveles adecuados de folato en sangre pueden neutralizar los posibles daños causados por la HHcy [Clarke et al, 2007], favoreciendo su efecto neuroprotector frente a la EA [Annerbo et al, 2005]. Por lo tanto, nos propusimos estudiar el efecto de la HHcy en ausencia y en presencia de EO después de eliminar el folato del medio del cultivo celular. Nos centramos en el papel de la HHcy moderada sobre la cascada apoptótica y estudiamos la proteólisis de PARP mediante western blot y la fragmentación del ADN (marcador tardío de apoptosis) mediante citometría de flujo.

En cuanto al estudio de la proteólisis de PARP, se pudo observar que la HHcy sola, en ausencia de folato, presentó una tendencia a incrementar la señal de p85 en comparación al mismo tratamiento con el adecuado aporte de folato (figura R-9). Esta tendencia se magnificó en el caso de la HHcy moderada en presencia de EO, pasando de ser una simple tendencia a ser un aumento de la señal apoptótica estadísticamente significativa. Esto implica que, efectivamente, la ausencia de folato potencia los efectos nocivos de la HHcy moderada. La HHcy en presencia de EO y en ausencia de folato, produce más proteólisis de PARP que la HHcy y el EO por separado, lo que sugiere que una HHcy moderada durante la vejez, si no se acompaña de un buen aporte vitamínico (especialmente de folato), activa la cascada apoptótica de PARP [Pak et al, 2003].

Continuamos con el seguimiento de la señal apoptótica, esta vez, analizando la fragmentación del ADN, que se da ya en los últimos estadios de la apoptosis. A las 48h, sigue la misma línea que la proteólisis de PARP: la ausencia de folato incrementa la fragmentación del ADN en todos los tratamientos (incluso en el control) lo cual implica que de acuerdo con los datos ya descritos la falta de esta vitamina es perjudicial para la homeostasis neuronal por sí misma [Mizrahi et al, 2003; Kimura et al, 2004; Ravaglia et al, 2005a]. Si además se produce una HHcy moderada en presencia de EO, la fragmentación del ADN aumenta más de dos veces respecto al control. El efecto nocivo de la HHcy moderada en estas circunstancias se mantiene, y a las 72h incluso llega a revertir el efecto protector de la HHcy frente al daño causado por el EO, que se observa en el medio con folato.

Por lo tanto, podemos concluir que la ausencia de folato, en la vejez, invierte el efecto de la HHcy moderada, la cual deja de ser un elemento neuroprotector para ser neurotóxico, y por tanto, un factor de riesgo a tener en cuenta en la EA [Seshadri et al, 2002; de Silva et al, 2005].

5.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL INDUCIDA POR LA HIPERHOMOCISTEINEMIA MODERADA EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE ESTRÉS OXIDATIVO.

Para obtener una valoración global de los efectos de la HHcy moderada y de ésta en presencia de EO a nivel genómico sobre nuestro modelo en neuroblastoma SK-N-MC, realizamos un estudio de la expresión génica mediante la técnica de microarrays de ADN (Applied Biosystems). Tratamos el cultivo con Hcy sola, por un lado, para analizar los efectos producidos por la HHcy moderada; por otro, con Xox que libera aniones superóxido, para producir el EO; y finalmente, con la combinación de ambos, para observar el efecto de la HHcy moderada en presencia de EO.

Se utilizó un tiempo de incubación fijo de 18h para todos los análisis de los microarrays de ADN. Nos planteamos conocer los genes que variaron su expresión en estos modelos celulares para investigar las funciones celulares que están alteradas por efecto de la HHcy moderada en ausencia y presencia de EO, que mimetiza los efectos de la HHcy moderada en la vejez.

En primer lugar, se elaboró un listado de genes que mostraban una expresión diferencial en el cultivo en condiciones de HHcy moderada frente al control (H versus C). De la misma manera, para el estudio de la HHcy moderada en presencia de EO, se elaboró una lista de la expresión génica diferencial del cultivo tratado con la combinación Hcy +Xox frente al cultivo en condiciones de EO (Xox) (XH versus X), obteniéndose en esta lista solamente los genes alterados por el efecto de la HHcy en condiciones de EO celular.

Una vez elaboradas las listas, el análisis global de los datos obtenidos mostraba que la HHcy moderada (100µM) solamente produjo una sutil alteración de la expresión génica, reforzando la hipótesis anteriormente citada de que la HHcy moderada, por sí misma, resulta ser un estímulo débil, el cual produjo únicamente ligeros cambios a nivel genómico, que no tienen por qué ser necesariamente nocivos para el sistema celular, como mostraban los estudios de viabilidad. Sin embargo, la HHcy moderada en presencia de EO produjo un mayor efecto en la expresión génica, tanto cuantitativa como cualitativamente, que la HHcy sola, sugiriendo que el efecto de la HHcy moderada se haría más patente bajo un EO crónico como en el que acompaña al envejecimiento.

Centrándonos en los resultados de expresión génica diferencial debida a la HHcy moderada (H versus C) observamos que se sobreexpresan aproximadamente medio centenar de genes y no llega a 70 los genes reprimidos que pasan la primera criba de significatividad (genes estadísticamente significativos en el análisis crudo), pero ninguno de ellos pasa satisfactoriamente el ajuste estadístico para test múltiples. Esto hace necesario el

abordaje de los datos desde un punto de vista funcional, realizando un estudio de conjunto, más que el análisis de los genes de forma aislada.

5.5 ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES MODULADOS POR LA HIPERHOMOCISTEINEMIA MODERADA EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE ESTRÉS OXIDATIVO.

Atendiendo al análisis funcional de los genes modulados por la HHcy moderada obtenemos que se activan procesos biológicos relacionados con la defensa e inmunidad y con el desarrollo del ectodermo y la neurogénesis, en los cuales están implicadas las interleukinas y las cadherinas, fundamentalmente, según el análisis mediante Panther®. Con Genecodis destacan las funciones de respuesta a estímulos abióticos y de unión a calcio; mientras que, con GSEA, no conseguimos extraer ningún dato significativo. Estos resultados que a primera vista pueden parecer dispares, mantienen una fuerte coherencia, ya que, tanto en defensa e inmunidad como en respuesta a estímulos abióticos, hay genes comunes. Así mismo ocurre en el caso la neurogénesis y la unión al calcio. El hecho de que por análisis distintos se llegue a un resultado común refuerza la significatividad de las rutas activadas por efecto de la HHcy moderada. Está descrito en la bibliografía que la Hcy estimula la producción de interleukinas [Dalal et al, 2003; Wang et al, 2005] promoviendo una reacción inflamatoria. Los resultados obtenidos en este modelo apoyarían esta hipótesis, aunque al ser la sobreexpresión tan liviana de los genes implicados, puede que el fenómeno proinflamatorio sea suave o neutralizado con una posterior regulación del sistema inmune. Por otro lado, el hecho que se sobreexpresen genes relacionados con la neurogénesis, podría resultar la causa de ese suave efecto de recuperación de la viabilidad observado mediante la liberación de LDH y a su vez, descrito en la bibliografía [Buemi et al 2001].

En cuanto a las funciones más relevantes que se extraen de la lista de genes reprimidos por la HHcy moderada (H versus C) podemos observar que se inhiben funciones relacionadas con la regulación del citoesqueleto por Rho-GTPasa, y con defensa (receptores de citoquinas) nuevamente, según Panther®. Respecto a los resultados obtenidos con Genecodis, obtenemos que el sector de los factores de transcripción es el más afectado. Los datos obtenidos de GSEA apoyan estos resultados anteriores, ya que abundan genes de defensa (NKTPathway) entre otros.

De estos datos deducimos que el efecto de la HHcy moderada sobre la defensa e inmunidad está finamente regulado, ya que en procesos implicados en defensa encontramos tanto genes sobreexpresados como reprimidos.

Por otro último, con el programa GSEA obtuvimos que la ruta de las caspasas se encontraba presente tanto entre los genes sobreexpresados como en los reprimidos (rutas mixtas). Este resultado apunta a que la Hcy ejerce una fina regulación de la cascada apoptótica. Entre los genes de la ruta de las caspasas, el hecho de que muchos de ellos se encuentren reprimidos por efecto de la HHcy moderada apoya el efecto anti-apoptótico observado tanto a nivel de la señal de p85 como de la fragmentación del ADN celular, reforzando la hipótesis que sostiene que la HHcy moderada realiza una fina regulación de la cascada apoptótica.

En resumen, la HHcy moderada activa las rutas vinculadas con la neurogénesis (las cuales favorecen la regeneración neuronal), reprime varios factores de transcripción y modula finamente las rutas vinculadas a la respuesta inmune, reforzando un papel neuroprotector observado en los estudios de viabilidad y de muerte por apoptosis.

Por otro lado, si nos fijamos en los genes regulados por el efecto de la HHcy moderada en presencia de EO (XH versus X) observamos que tanto los genes sobreexpresados como los reprimidos pasaron satisfactoriamente el ajuste estadístico para test múltiples. Además,

Discusión

cuantitativamente, los cambios de expresión génica son mayores (hasta casi 7 veces en los sobreexpresados y más de 4 veces en los reprimidos) que en la comparación H vs C. Estos genes, atendiendo al diagrama de Venn de los 300 genes más significativos, corresponden aproximadamente a un tercio de aquellos que conformaba la lista de los genes regulados por efecto de la combinación de tratamientos (XH vs C). También se pudo observar que prácticamente no hay genes comunes con la lista de genes de HHcy sola (H vs C), lo cual implica que la HHcy, en presencia de EO, no solo tiene mayor calado en la expresión génica, sino que los genes diana son distintos a los modulados por la HHcy en ausencia de EO. Paradójicamente, las funciones afectadas son muy similares, como veremos a continuación.

Profundizando en el análisis funcional del listado de genes sobreexpresados por la HHcy en presencia de EO (XH versus X), destacamos nuevamente genes vinculados con la defensa e inmunidad: así, genes que codifican para proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA-DRB4), para proteínas relacionadas con el interferón (IRF4), o para receptores de TNF (TNFRSF1B), entre otros, presentan una expresión de más de 3 veces respecto al tratamiento con Xox únicamente. También hay que destacar en la lista de los sobreexpresados una serie de genes vinculados al transporte de gases y de solutos en sangre, como el gen que codifica para la proteína de transporte facilitado de glucosa (SLC2A2). Estas observaciones coinciden con las funciones más relevantes obtenidas por Panther®. En Genecodis los genes implicados en estas funciones vuelven a coincidir bajo el título de transporte a nivel de la membrana celular y de glicoproteínas.

De esta información deducimos que la célula bajo la HHcy moderada en presencia de EO prepara su sistema de defensa para protegerse ante cualquier ataque adicional, produciendo una sensibilización de ésta. De la misma manera aumenta la expresión de los transportadores de glucosa y de gases para obtener así más energía. Ante el tratamiento con Hcy en un ambiente con EO, se desencadena una reacción de alerta celular tanto a nivel del sistema de defensa como del energético que no se produce cuando sólo hay EO,

en ausencia de Hcy. Por lo tanto parece que la HHcy moderada produce, en este caso, un efecto de protección frente al EO, lo cual apoya los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular.

Por otra parte, si nos centramos en los genes reprimidos en la comparación XH versus X, en primer lugar vemos que vuelven a aparecer genes implicados en la defensa e inmunidad (HLA-DPA1, IL17RB) entre los genes más inhibidos, reforzando la idea de que la Hcy produce una fina regulación sobre genes relacionados con la respuesta inmune, provocando un estado de defensa sin llegar a producir daños celulares.

Si atendemos, por otro lado, al análisis funcional, observamos que las rutas más inhibidas son las vinculadas a los receptores metabotrópicos del glutamato y del receptor de GABA así como a la ruta endógena de los cannabinoides. Observando más detalladamente, vemos que hay una inhibición de estas vías a todos los niveles ya que se inhiben genes que codifican tanto para proteínas implicadas en la transcripción como en producir modificaciones post-traduccionales de las proteínas, como la fosforilación. Esta información está apoyada tanto por los datos obtenidos en Panther® como en Genecodis, lo cual refuerza la credibilidad de estos resultados. Este hallazgo apoya la hipótesis de que la HHcy moderada, sin la sobreexcitación por parte de la glicina, es un estímulo débil y por lo tanto no se manifiesta la excitotoxicidad descrita por la sobreexcitación de los receptores de glutamato [Zieminska et al, 2003; Zieminska et al, 2006]. Además el aporte de vitamina E es el adecuado en el cultivo celular y esta vitamina neuroprotectora evita la excitotoxicidad producida por la Hcy en los mGluR, bloqueando el acceso del ácido araquidónico al centro catalítico de la 12-LOX [Khanna et al, 2003]

Por otro lado, la HHcy moderada en presencia de EO también inhibe la vía de los receptores GABA, que es el principal neurotransmisor inhibitor del cerebro, lo cual es contrario a lo descrito en la bibliografía. Parece ser que las concentraciones moderadas de Hcy con un

aporte adecuado de las vitaminas neuroprotectoras (vitamina E, B9, B6 y B12), no sólo no producen excitotoxicidad sino que protegen contra ésta.

Resumiendo, la HHcy en presencia de EO promueve una respuesta génica que conduce a una mayor protección celular que la HHcy sola, ya que no sólo regula las rutas vinculadas con el sistema inmune sino que además aumenta la expresión de genes relacionados con el transporte de gases y de glucosa a las neuronas, por un lado, y reprime los genes implicados en excitotoxicidad, por otro.

5.6 ASOCIACIÓN DE GENES RELEVANTES DEL CICLO DEL FOLATO CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Nuestros datos sugieren que la Hcy y el folato pueden jugar un papel importante en el mantenimiento de la viabilidad celular, en un modelo de neuronas humanas, especialmente en condiciones de EO.

Si, como sugieren los resultados obtenidos en el modelo “in vitro”, los niveles de Hcy fueron relevantes para la viabilidad neuronal, podríamos suponer que polimorfismos en genes clave en la regulación de los niveles de Hcy contribuirán a una variabilidad en la capacidad de regular dichos niveles, y por tanto, a la susceptibilidad a enfermedades neurodegenerativas como la EA.

En ese sentido, el ciclo del folato es una ruta clave del metabolismo de la Hcy, está descrito que alteraciones en los genes que regulan este ciclo, como la MTHFR [Religa et al, 2003] y la MTRR [Gaughan et al, 2001], aumentan a los niveles de Hcy en sangre. De hecho, determinados polimorfismos de estos genes también se han citado como factores de riesgo para varias enfermedades [Bagley et al, 1998; Hobbs et al, 2000] incluyendo la EA [Miller et al, 2003; Nilsson et al, 2004; Ellinson et al, 2004, Wang et al, 2005]

Por lo tanto, se realizó un estudio de asociación caso-control para comprobar que sucedía en una muestra de población española. Se analizaron dos polimorfismos de la MTHFR (C677T y A1298C) y uno de la MTRR (G66A) mediante PCR a tiempo real. Los resultados obtenidos de este análisis mostraron, en primera instancia, que el polimorfismo C677T de la MTHFR era el único que estaba vinculado a la EA de forma estadísticamente significativa. No obstante, el polimorfismo A1298C de la MTHFR, que es uno de los destacados como asociado a la EA en un meta-análisis exhaustivo [Bertram et al, 2007], en este estudio tenía más bien un papel potenciador del efecto producido por el polimorfismo C677T.

El dato más importante de este análisis genético es que el alelo C del polimorfismo C677T confiere riesgo para la EA y el alelo T es el que confiere protección. El alelo 677T produce una versión termolábil de la enzima, menos funcional provocando una HHcy moderada [Religa et al, 2003], lo cual encaja perfectamente con los resultados obtenidos en el modelo celular, donde se ha manifestado el papel neuroprotector de Hcy dentro del rango de HHcy moderada.

Encontramos en la bibliografía estudios que apoyan nuestros resultados [Wakutani et al, 2004a], www.alzgene.org [Bertram et al, 2007]. Sin embargo, contrasta con el descrito por determinados autores que sostienen que el alelo que confiere mayor riesgo para la EA es el 677T [Wang et al, 2005]. Estas discrepancias pueden deberse, posiblemente, de las diferencia poblacionales, ya que hemos comprobado que el riesgo vinculado al polimorfismo C677T de la MTHFR depende de otros factores, genéticos (el alelo APOE4, el SNP A1298C de la MTHFR) y no genéticos (sexo). En este sentido, como sugieren nuestros resultados, es muy importante la dieta, especialmente el aporte de folato, que puede variar en diferentes poblaciones.

Discusión

Por último, no se puede descartar que la asociación de la MTHFR con la EA no dependa del papel de esta enzima en relación con los niveles de Hcy, sino con otras importantes funciones del ciclo del folato, como las relacionadas con la metilación y el metabolismo de 1-carbono a través de SAM [Lu et al, 2000]. En todo caso, el modo en el que este alelo confiere riesgo para la EA es todavía una incógnita.

Conclusiones

1. La Hcy a concentraciones en el rango de 0 a 100 μ M (HHcy moderada) es un estímulo suave y no produce necrosis ni apoptosis. En el caso de la apoptosis, a nivel tanto de la proteólisis de PARP como de la fragmentación del ADN, se observa una tendencia protectora frente a la apoptosis que incrementa con la concentración de Hcy.
2. En una situación de EO celular, la HHcy moderada tiene un papel fundamentalmente protector, tanto a nivel de la viabilidad celular como frente los efectos pro-apoptóticos desencadenados por el propio EO.
3. La ausencia de folato incrementa notablemente el efecto pro-apoptótico de la HHcy moderada en una situación de EO. No solamente anula el papel protector de la HHcy sino que agrava la señal pro-apoptótica del EO, tanto a nivel de la cascada de PARP como de la fragmentación del ADN.
4. En el análisis genómico, la HHcy moderada se presenta como un estímulo suave, favoreciendo la neurogénesis y regulando finamente las rutas relacionadas con la defensa e inmunidad y con la apoptosis a través de la cascada de las caspasas.
5. La HHcy moderada en una situación de EO celular, se revela como un estímulo más fuerte que la HHcy moderada sola. Su papel protector se vuelve a revelar incrementando la expresión de genes responsables del transporte de gases y glucosa a la neurona, regulando finamente los genes de defensa e inmunidad e inhibiendo rutas clave para la producción de excitotoxicidad.
6. Los estudios de asociación genética indican que ser portador del alelo C del polimorfismo 677 de la MTHFR confiere riesgo para la EA frente a los no portadores. Este riesgo se agrava estratificando la muestra por el genotipo AA del polimorfismo 1298 de la MTHFR, por el sexo masculino, y por el hecho de ser portador del alelo APOE4. A su vez, el alelo 677T de la MTHFR confiere protección frente a la EA, el cual está vinculado a la producción de HHcy moderada.

Conclusiones

Conclusión final:

La homocisteína hasta concentraciones de hiperhomocisteinemia moderada ($100\mu\text{M}$) tiene capacidad neuroprotectora, en especial frente al daño oxidativo, siempre que el aporte de folato sea el adecuado. Dicha capacidad podría ser la responsable de que variantes genéticas de la MTHFR asociadas a hiperhomocisteinemia moderada disminuyan el riesgo de padecer la Enfermedad de Alzheimer. No obstante, si el aporte de folato es deficiente, la hiperhomocisteinemia moderada se transforma en un factor neurotóxico, mostrando la importancia del folato en regulación de la neurotoxicidad mediada por homocisteína.

Bibliografía

- Agnati, L. F., S. Genedani, et al. (2007). "Abeta peptides as one of the crucial volume transmission signals in the trophic units and their interactions with homocysteine. Physiological implications and relevance for Alzheimer's disease." *J Neural Transm* 114(1): 21-31.
- Agnati, L. F., S. Genedani, et al. (2005). "Studies on homocysteine plasma levels in Alzheimer's patients. Relevance for neurodegeneration." *J Neural Transm* 112(1): 163-9.
- Aleardi, A. M., G. Benard, et al. (2005). "Gradual alteration of mitochondrial structure and function by beta-amyloids: importance of membrane viscosity changes, energy deprivation, reactive oxygen species production, and cytochrome c release." *J Bioenerg Biomembr* 37(4): 207-25.
- Almeida, O. P., L. Flicker, et al. (2005). "Contribution of the MTHFR gene to the causal pathway for depression, anxiety and cognitive impairment in later life." *Neurobiol Aging* 26(2): 251-7.
- Altman, F. P. (1976). "Tetrazolium salts and formazans." *Prog Histochem Cytochem* 9(3): 1-56.
- Anello, G., R. M. Gueant-Rodriguez, et al. (2004). "Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in Alzheimer's disease." *Neuroreport* 15(5): 859-61.
- Annerbo, S., L. O. Wahlund, et al. (2005). "The relation between homocysteine levels and development of Alzheimer's disease in mild cognitive impairment patients." *Dement Geriatr Cogn Disord* 20(4): 209-14.
- Ariogul, S., M. Cankurtaran, et al. (2005). "Vitamin B12, folate, homocysteine and dementia: are they really related?" *Arch Gerontol Geriatr* 40(2): 139-46.
- Bagley, P. J. and J. Selhub (1998). "A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(22): 13217-20.
- Barbato, J. C., O. Catanescu, et al. (2007). "Targeting of metallothionein by L-homocysteine: a novel mechanism for disruption of zinc and redox homeostasis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(1): 49-54.

Bibliografía

- Baydas, G., S. Kutlu, et al. (2003). "Inhibitory effects of melatonin on neural lipid peroxidation induced by intracerebroventricularly administered homocysteine." *J Pineal Res* 34(1): 36-9.
- Bernasconi, A. R., A. Liste, et al. (2006). "Folic acid 5 or 15 mg/d similarly reduces plasma homocysteine in patients with moderate-advanced chronic renal failure." *Nephrology (Carlton)* 11(2): 137-41.
- Berridge, M. V. and A. S. Tan (1993). "Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction." *Arch Biochem Biophys* 303(2): 474-82.
- Bertram, L., M. B. McQueen, et al. (2007). "Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database." *Nat Genet* 39(1): 17-23.
- Bertram, L. and R. E. Tanzi (2004). "Alzheimer's disease: one disorder, too many genes?" *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1: R135-41.
- Bertram, L. and R. E. Tanzi (2004). "The current status of Alzheimer's disease genetics: what do we tell the patients?" *Pharmacol Res* 50(4): 385-96.
- Brunelli, T., S. Bagnoli, et al. (2001). "The C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation is not associated with Alzheimer's disease." *Neurosci Lett* 315(1-2): 103-5.
- Buemi, M., D. Marino, et al. (2001). "Effects of homocysteine on proliferation, necrosis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture and influence of folic acid." *Thromb Res* 104(3): 207-13.
- Bullido, M. J., M. J. Artiga, et al. (1998). "A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia." *Nat Genet* 18(1): 69-71.
- Bullido, M. J., A. Martinez-Garcia, et al. (2007). "A TAP2 genotype associated with Alzheimer's disease in APOE4 carriers." *Neurobiol Aging* 28(4): 519-23.
- Carmona-Saez, P., M. Chagoyen, et al. (2007). "GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists." *Genome Biol* 8(1): R3.

- Castellani, R. J., M. A. Smith, et al. (2004). "Cerebral amyloid angiopathy: major contributor or decorative response to Alzheimer's disease pathogenesis." *Neurobiol Aging* 25(5): 599-602; discussion 603-4.
- Cavallaro, R. A., A. Fusco, et al. (2006). "The effect of S-adenosylmethionine on CNS gene expression studied by cDNA microarray analysis." *J Alzheimers Dis* 9(4): 415-9.
- Chavarria, T., S. Rodriguez-Nieto, et al. (2003). "Homocysteine is a potent inhibitor of human tumor cell gelatinases." *Biochem Biophys Res Commun* 303(2): 572-5.
- Chern, C. L., R. F. Huang, et al. (2001). "Folate deficiency-induced oxidative stress and apoptosis are mediated via homocysteine-dependent overproduction of hydrogen peroxide and enhanced activation of NF-kappaB in human Hep G2 cells." *Biomed Pharmacother* 55(8): 434-42.
- Christie, L. A., G. Riedel, et al. (2005). "Enhanced hippocampal long-term potentiation in rats after chronic exposure to homocysteine." *Neurosci Lett* 373(2): 119-24.
- Clarke, R., S. Lewington, et al. (2007). "Effects of B-vitamins on plasma homocysteine concentrations and on risk of cardiovascular disease and dementia." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10(1): 32-9.
- Corder, E. H., A. M. Saunders, et al. (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." *Science* 261(5123): 921-3.
- Corder, E. H., M. A. Woodbury, et al. (2000). "Density profiles of Alzheimer disease regional brain pathology for the huddinge brain bank: pattern recognition emulates and expands upon Braak staging." *Exp Gerontol* 35(6-7): 851-64.
- Dalal, S., S. M. Parkin, et al. (2003). "Effect of homocysteine on cytokine production by human endothelial cells and monocytes." *Ann Clin Biochem* 40(Pt 5): 534-41.
- De Silva, H. A., S. B. Gunatilake, et al. (2005). "Medial temporal lobe atrophy, apolipoprotein genotype, and plasma homocysteine in Sri Lankan patients with Alzheimer's disease." *Exp Aging Res* 31(3): 345-54.
- De Strooper, B. (2007). "Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease." *EMBO Rep* 8(2): 141-6.

Bibliografía

De Strooper, B., W. Annaert, et al. (1999). "A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain." *Nature* 398(6727): 518-22.

Diaz-Arrastia, R. (2000). "Homocysteine and neurologic disease." *Arch Neurol* 57(10): 1422-7.

Dwyer, B. E., A. K. Raina, et al. (2004). "Homocysteine and Alzheimer's disease: a modifiable risk?" *Free Radic Biol Med* 36(11): 1471-5.

Ellinson, M., J. Thomas, et al. (2004). "A critical evaluation of the relationship between serum vitamin B, folate and total homocysteine with cognitive impairment in the elderly." *J Hum Nutr Diet* 17(4): 371-83; quiz 385-7.

Esler, W. P., W. T. Kimberly, et al. (2000). "Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1." *Nat Cell Biol* 2(7): 428-34.

Fernandez, L. L. and R. M. Scheibe (2005). "Is MTHFR polymorphism a risk factor for Alzheimer's disease like APOE?" *Arq Neuropsiquiatr* 63(1): 1-6.

Finkelstein, J. D. (1998). "The metabolism of homocysteine: pathways and regulation." *Eur J Pediatr* 157 Suppl 2: S40-4.

Flicker, L., R. N. Martins, et al. (2004). "Homocysteine, Alzheimer genes and proteins, and measures of cognition and depression in older men." *J Alzheimers Dis* 6(3): 329-36.

Flirski, M. and T. Sobow (2005). "Biochemical markers and risk factors of Alzheimer's disease." *Curr Alzheimer Res* 2(1): 47-64.

Folin, M., S. Baiguera, et al. (2005). "A cross-sectional study of homocysteine-, NO-levels, and CT-findings in Alzheimer dementia, vascular dementia and controls." *Biogerontology* 6(4): 255-60.

Foncea, R., C. Carvajal, et al. (2000). "Endothelial cell oxidative stress and signal transduction." *Biol Res* 33(2): 89-96.

Fuso, A., L. Seminara, et al. (2005). "S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production." *Mol Cell Neurosci* 28(1): 195-204.

Gallucci, M., A. Zanardo, et al. (2004). "Homocysteine in Alzheimer disease and vascular dementia." *Arch Gerontol Geriatr Suppl*(9): 195-200.

Gaughan, D. J., L. A. Kluijtmans, et al. (2001). "The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations." *Atherosclerosis* 157(2): 451-6.

Girgis, S., J. R. Suh, et al. (1997). "5-Formyltetrahydrofolate regulates homocysteine remethylation in human neuroblastoma." *J Biol Chem* 272(8): 4729-34.

Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." *Nature* 349(6311): 704-6.

Gottfries, J., K. Blennow, et al. (2001). "One-carbon metabolism and other biochemical correlates of cognitive impairment as visualized by principal component analysis." *J Geriatr Psychiatry Neurol* 14(3): 109-14.

Hardy, J. and K. Gwinn-Hardy (1998). "Genetic classification of primary neurodegenerative disease." *Science* 282(5391): 1075-9.

Hasegawa, T., W. Ukai, et al. (2005). "Homocysteic acid induces intraneuronal accumulation of neurotoxic Aβ42: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." *J Neurosci Res* 80(6): 869-76.

Ho, P. I., D. Ortiz, et al. (2002). "Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage." *J Neurosci Res* 70(5): 694-702.

Hobbs, C. A., S. L. Sherman, et al. (2000). "Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome." *Am J Hum Genet* 67(3): 623-30.

Holtzman, D. M., K. R. Bales, et al. (2000). "Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6): 2892-7.

Hong, S. J., T. M. Dawson, et al. (2004). "Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling." *Trends Pharmacol Sci* 25(5): 259-64.

Bibliografía

Huang, G., M. Dragan, et al. (2005). "Activation of catechol-O-methyltransferase in astrocytes stimulates homocysteine synthesis and export to neurons." *Glia* 51(1): 47-55.

Huang, H. Y., L. J. Appel, et al. (2002). "Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial." *Am J Clin Nutr* 76(3): 549-55.

Huang, R. F., S. M. Huang, et al. (2001). "Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells." *Life Sci* 68(25): 2799-811.

Hultberg, B., E. Agardh, et al. (1991). "Increased levels of plasma homocysteine are associated with nephropathy, but not severe retinopathy in type 1 diabetes mellitus." *Scand J Clin Lab Invest* 51(3): 277-82.

Irizarry, M. C. (2004). "Biomarkers of Alzheimer disease in plasma." *NeuroRx* 1(2): 226-34.

Irizarry, M. C., M. E. Gurol, et al. (2005). "Association of homocysteine with plasma amyloid beta protein in aging and neurodegenerative disease." *Neurology* 65(9): 1402-8.

Itzhaki, R. F., W. R. Lin, et al. (1997). "Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease." *Lancet* 349(9047): 241-4.

Jakubowski, H. (2006). "Pathophysiological consequences of homocysteine excess." *J Nutr* 136(6 Suppl): 1741S-1749S.

Jara-Prado, A., A. Ortega-Vazquez, et al. (2003). "Homocysteine-induced brain lipid peroxidation: effects of NMDA receptor blockade, antioxidant treatment, and nitric oxide synthase inhibition." *Neurotox Res* 5(4): 237-43.

Ji, C. and N. Kaplowitz (2004). "Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury." *World J Gastroenterol* 10(12): 1699-708.

Joosten, E., E. Lesaffre, et al. (1997). "Is metabolic evidence for vitamin B-12 and folate deficiency more frequent in elderly patients with Alzheimer's disease?" *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 52(2): M76-9.

- Katzman, R. (1986). "Alzheimer's disease." *N Engl J Med* 314(15): 964-73.
- Kauppinen, T. M. and R. A. Swanson (2007). "The role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in CNS disease." *Neuroscience* 145(4): 1267-72.
- Kehoe, P., F. Wavrant-De Vrieze, et al. (1999). "A full genome scan for late onset Alzheimer's disease." *Hum Mol Genet* 8(2): 237-45.
- Kennedy, B. P., T. Bottiglieri, et al. (2004). "Elevated S-adenosylhomocysteine in Alzheimer brain: influence on methyltransferases and cognitive function." *J Neural Transm* 111(4): 547-67.
- Khanna, S., S. Roy, et al. (2003). "Molecular basis of vitamin E action: tocotrienol modulates 12-lipoxygenase, a key mediator of glutamate-induced neurodegeneration." *J Biol Chem* 278(44): 43508-15.
- Kimura, M., K. Umegaki, et al. (2004). "Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes." *J Nutr* 134(1): 48-56.
- Knott, L., T. Hartridge, et al. (2003). "Homocysteine oxidation and apoptosis: a potential cause of cleft palate." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 39(1-2): 98-105.
- Koh, J. M., Y. S. Lee, et al. (2006). "Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through increased intracellular ROS generation." *J Bone Miner Res* 21(7): 1003-11.
- Kokame, K., K. L. Agarwala, et al. (2000). "Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress." *J Biol Chem* 275(42): 32846-53.
- Kowalska, A. (2004). "[The beta-amyloid cascade hypothesis: a sequence of events leading to neurodegeneration in Alzheimer's disease]." *Neurol Neurochir Pol* 38(5): 405-11.
- Krantic, S., N. Mechawar, et al. (2007). "Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life and death." *Prog Neurobiol* 81(3): 179-96.

Bibliografía

Kruman, Il, C. Culmsee, et al. (2000). "Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity." *J Neurosci* 20(18): 6920-6.

Kruman, Il, T. S. Kumaravel, et al. (2002). "Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease." *J Neurosci* 22(5): 1752-62.

Krumdieck, C. L. and C. W. Prince (2000). "Mechanisms of homocysteine toxicity on connective tissues: implications for the morbidity of aging." *J Nutr* 130(2S Suppl): 365S-368S.

Kumar, A., L. John, et al. (2006). "Homocysteine- and cysteine-mediated growth defect is not associated with induction of oxidative stress response genes in yeast." *Biochem J* 396(1): 61-9.

Lazarewicz, J. W., A. Ziembowicz, et al. (2003). "Homocysteine-evoked ⁴⁵Ca release in the rabbit hippocampus is mediated by both NMDA and group I metabotropic glutamate receptors: in vivo microdialysis study." *Neurochem Res* 28(2): 259-69.

LeBlanc, A. C. (2005). "The role of apoptotic pathways in Alzheimer's disease neurodegeneration and cell death." *Curr Alzheimer Res* 2(4): 389-402.

Leblhuber, F., J. Walli, et al. (2000). "Hyperhomocysteinemia in dementia." *J Neural Transm* 107(12): 1469-74.

Lee, H. G., M. Ueda, et al. (2006). "Aberrant localization of importin alpha1 in hippocampal neurons in Alzheimer disease." *Brain Res* 1124(1): 1-4.

Lentz, S. R. and J. E. Sadler (1993). "Homocysteine inhibits von Willebrand factor processing and secretion by preventing transport from the endoplasmic reticulum." *Blood* 81(3): 683-9.

Levy-Lahad, E., W. Wasco, et al. (1995). "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus." *Science* 269(5226): 973-7.

Li, H., A. Lewis, et al. (2002). "Homocysteine induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase in vascular endothelial cells: a mechanism for development of atherosclerosis?" *Circulation* 105(9): 1037-43.

Li, Y. M., M. T. Lai, et al. (2000). "Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11): 6138-43.

Lipton, S. A., W. K. Kim, et al. (1997). "Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(11): 5923-8.

Lockhart, B., C. Jones, et al. (2000). "Inhibition of L-homocysteic acid and buthionine sulfoximine-mediated neurotoxicity in rat embryonic neuronal cultures with alpha-lipoic acid enantiomers." *Brain Res* 855(2): 292-7.

Lu, S. C. (2000). "S-Adenosylmethionine." *Int J Biochem Cell Biol* 32(4): 391-5.

Luchsinger, J. A., M. X. Tang, et al. (2004). "Plasma homocysteine levels and risk of Alzheimer disease." *Neurology* 62(11): 1972-6.

Malaguarnera, M., R. Ferri, et al. (2004). "Homocysteine, vitamin B12 and folate in vascular dementia and in Alzheimer disease." *Clin Chem Lab Med* 42(9): 1032-5.

Maler, J. M., W. Seifert, et al. (2003). "Homocysteine induces cell death of rat astrocytes in vitro." *Neurosci Lett* 347(2): 85-8.

Martinez-Poveda, B., T. Chavarria, et al. (2003). "An in vitro evaluation of the effects of homocysteine thiolactone on key steps of angiogenesis and tumor invasion." *Biochem Biophys Res Commun* 311(3): 649-53.

Mattson, M. P. (1997). "Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives." *Physiol Rev* 77(4): 1081-132.

Mattson, M. P., Q. Guo, et al. (1998). "Presenilins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease." *J Neurochem* 70(1): 1-14.

Mattson, M. P. and T. B. Shea (2003). "Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders." *Trends Neurosci* 26(3): 137-46.

Bibliografía

- Mayer, E. L., D. W. Jacobsen, et al. (1996). "Homocysteine and coronary atherosclerosis." *J Am Coll Cardiol* 27(3): 517-27.
- Miller, A. L. (2003). "The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases." *Altern Med Rev* 8(1): 7-19.
- Mills, J. L., J. M. McPartlin, et al. (1995). "Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects." *Lancet* 345(8943): 149-51.
- Mizrahi, E. H., D. W. Jacobsen, et al. (2003). "Plasma total homocysteine levels, dietary vitamin B6 and folate intake in AD and healthy aging." *J Nutr Health Aging* 7(3): 160-5.
- Mok, S. S., B. J. Turner, et al. (2002). "Toxicity of substrate-bound amyloid peptides on vascular smooth muscle cells is enhanced by homocysteine." *Eur J Biochem* 269(12): 3014-22.
- Molgaard, C.A., E. P. Stanford, et al. (1990). "Epidemiology of head trauma and neurocognitive impairment in a multi-ethnic population." *Neuroepidemiology* 9(5): 233-42.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- Mudd, S. H. (1985). "Vascular disease and homocysteine metabolism." *N Engl J Med* 313(12): 751-3.
- Mujumdar, V. S., C. M. Tummalapalli, et al. (2002). "Mechanism of constrictive vascular remodeling by homocysteine: role of PPAR." *Am J Physiol Cell Physiol* 282(5): C1009-15.
- Mulder, C., N. S. Schoonenboom, et al. (2005). "The transmethylation cycle in the brain of Alzheimer patients." *Neurosci Lett* 386(2): 69-71.
- Nagy, Z. S., M. Z. Smith, et al. (2000). "Hyperhomocysteinaemia in Alzheimer's disease and expression of cell cycle markers in the brain." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 69(4): 565-6.
- Nilsson, K., L. Gustafson, et al. (2002). "Relation between plasma homocysteine and Alzheimer's disease." *Dement Geriatr Cogn Disord* 14(1): 7-12.

- Nilsson, K., L. Gustafson, et al. (2004). "Plasma homocysteine concentration relates to the severity but not to the duration of Alzheimer's disease." *Int J Geriatr Psychiatry* 19(7): 666-72.
- Obeid, R. and W. Herrmann (2006). "Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia." *FEBS Lett* 580(13): 2994-3005.
- Octave, J. N. (1995). "The amyloid peptide precursor in Alzheimer's disease." *Acta Neurol Belg* 95(4): 197-209.
- Olthof, M. R. and P. Verhoef (2005). "Effects of betaine intake on plasma homocysteine concentrations and consequences for health." *Curr Drug Metab* 6(1): 15-22.
- Ott, A., R. P. Stolk, et al. (1996). "Association of diabetes mellitus and dementia: the Rotterdam Study." *Diabetologia* 39(11): 1392-7.
- Ou, X., H. Yang, et al. (2007). "Inhibition of human betaine-homocysteine methyltransferase expression by S-adenosylmethionine and methylthioadenosine." *Biochem J* 401(1): 87-96.
- Outinen, P. A., S. K. Sood, et al. (1998). "Characterization of the stress-inducing effects of homocysteine." *Biochem J* 332 (Pt 1): 213-21.
- Pak, K. J., S. L. Chan, et al. (2003). "Homocysteine and folate deficiency sensitize oligodendrocytes to the cell death-promoting effects of a presenilin-1 mutation and amyloid beta-peptide." *Neuromolecular Med* 3(2): 119-28.
- Postiglione, A., G. Milan, et al. (2001). "Plasma folate, vitamin B(12), and total homocysteine and homozygosity for the C677T mutation of the 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase gene in patients with Alzheimer's dementia. A case-control study." *Gerontology* 47(6): 324-9.
- Pugliese, M., C. Gangitano, et al. (2007). "Canine cognitive dysfunction and the cerebellum: Acetylcholinesterase reduction, neuronal and glial changes." *Brain Res*.
- Quadri, P., C. Fragiaco, et al. (2004). "Homocysteine, folate, and vitamin B-12 in mild cognitive impairment, Alzheimer disease, and vascular dementia." *Am J Clin Nutr* 80(1): 114-22.

Bibliografía

Racek, J., H. Rusnakova, et al. (2005). "The influence of folate and antioxidants on homocysteine levels and oxidative stress in patients with hyperlipidemia and hyperhomocysteinemia." *Physiol Res* 54(1): 87-95.

Rago, R., J. Mitchen, et al. (1991). "Disruption of cellular energy balance by suramin in intact human prostatic carcinoma cells, a likely antiproliferative mechanism." *Cancer Res* 51(24): 6629-35.

Ravaglia, G., P. Forti, et al. (2005). "Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease." *Am J Clin Nutr* 82(3): 636-43.

Ravaglia, G., P. Forti, et al. (2004). "Common polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): relationships with plasma homocysteine concentrations and cognitive status in elderly northern italian subjects." *Arch Gerontol Geriatr Suppl*(9): 339-48.

Ravaglia, G., P. Forti, et al. (2004). "Homocysteine and cognitive performance in healthy elderly subjects." *Arch Gerontol Geriatr Suppl*(9): 349-57.

Refsum, H., O. Nygard, et al. (1996). "The Hordaland homocysteine study: the opposite tails odds ratios reveal differential effects of gender and intake of vitamin supplements at high and low plasma total homocysteine concentrations." *J Nutr* 126(4 Suppl): 1244S-8S.

Religa, D., M. Styczynska, et al. (2003). "Homocysteine, apolipoproteine E and methylenetetrahydrofolate reductase in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment." *Dement Geriatr Cogn Disord* 16(2): 64-70.

Rogaev, E. I., R. Sherrington, et al. (1995). "Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene." *Nature* 376(6543): 775-8.

Rolland, P. H., A. Friggi, et al. (1995). "Hyperhomocysteinemia-induced vascular damage in the minipig. Captopril-hydrochlorothiazide combination prevents elastic alterations." *Circulation* 91(4): 1161-74.

Rudy, A., I. Kowalska, et al. (2005). "Homocysteine concentrations and vascular complications in patients with type 2 diabetes." *Diabetes Metab* 31(2): 112-7.

Sachdev, P. (2004). "Homocysteine, cerebrovascular disease and brain atrophy." *J Neurol Sci* 226(1-2): 25-9.

Sachdev, P. S. (2005). "Homocysteine and brain atrophy." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29(7): 1152-61.

Sai, X., Y. Kawamura, et al. (2002). "Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid beta-protein." *J Biol Chem* 277(15): 12915-20.

Sawle, P., R. Foresti, et al. (2001). "Homocysteine attenuates endothelial haem oxygenase-1 induction by nitric oxide (NO) and hypoxia." *FEBS Lett* 508(3): 403-6.

Scarpa, S., R. A. Cavallaro, et al. (2006). "Gene silencing through methylation: an epigenetic intervention on Alzheimer disease." *J Alzheimers Dis* 9(4): 407-14.

Scarpa, S., A. Fusco, et al. (2003). "Presenilin 1 gene silencing by S-adenosylmethionine: a treatment for Alzheimer disease?" *FEBS Lett* 541(1-3): 145-8.

Schroeksnadel, K., F. Leblhuber, et al. (2004). "Association of hyperhomocysteinemia in Alzheimer disease with elevated neopterin levels." *Alzheimer Dis Assoc Disord* 18(3): 129-33.

Schupf, N., D. Kapell, et al. (2001). "Specificity of the fivefold increase in AD in mothers of adults with Down syndrome." *Neurology* 57(6): 979-84.

Selkoe, D. and R. Kopan (2003). "Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration." *Annu Rev Neurosci* 26: 565-97.

Selkoe, D. J. (1999). "Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease." *Nature* 399(6738 Suppl): A23-31.

Selley, M. L. (2004). "Increased homocysteine and decreased adenosine formation in Alzheimer's disease." *Neurol Res* 26(5): 554-7.

Serot, J. M., F. Barbe, et al. (2005). "Homocysteine and methylmalonic acid concentrations in cerebrospinal fluid: relation with age and Alzheimer's disease." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76(11): 1585-7.

Bibliografía

Seshadri, S., A. Beiser, et al. (2002). "Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease." *N Engl J Med* 346(7): 476-83.

Sharma, P., R. D. Senthilkumar, et al. (2006). "Mining literature for a comprehensive pathway analysis: a case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies." *Lipids Health Dis* 5: 1.

Shastri, S., L. Moning, et al. (2005). "GABA receptors and nitric oxide ameliorate constrictive collagen remodeling in hyperhomocysteinemia." *J Cell Physiol* 205(3): 422-7.

Shea, T. B., J. Lyons-Weiler, et al. (2002). "Homocysteine, folate deprivation and Alzheimer neuropathology." *J Alzheimers Dis* 4(4): 261-7.

Shearman, M. S., S. R. Hawtin, et al. (1995). "The intracellular component of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction is specifically inhibited by beta-amyloid peptides." *J Neurochem* 65(1): 218-27.

Shearman, M. S., C. I. Ragan, et al. (1994). "Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(4): 1470-4.

Sherrington, R., E. I. Rogaev, et al. (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." *Nature* 375(6534): 754-60.

Shi, Q., J. E. Savage, et al. (2003). "L-homocysteine sulfinic acid and other acidic homocysteine derivatives are potent and selective metabotropic glutamate receptor agonists." *J Pharmacol Exp Ther* 305(1): 131-42.

Siow, Y. L., K. K. Au-Yeung, et al. (2006). "Homocysteine stimulates phosphorylation of NADPH oxidase p47phox and p67phox subunits in monocytes via protein kinase Cbeta activation." *Biochem J* 398(1): 73-82.

Sisodia, S. S., E. H. Koo, et al. (1990). "Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing." *Science* 248(4954): 492-5.

Sisodia, S. S. and P. H. St George-Hyslop (2002). "gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in?" *Nat Rev Neurosci* 3(4): 281-90.

Skoog, I., B. Lernfelt, et al. (1996). "15-year longitudinal study of blood pressure and dementia." *Lancet* 347(9009): 1141-5.

Skovby, F., N. Krassikoff, et al. (1984). "Assignment of the gene for cystathionine beta-synthase to human chromosome 21 in somatic cell hybrids." *Hum Genet* 65(3): 291-4.

Small, D. H. (1998). "The role of the amyloid protein precursor (APP) in Alzheimer's disease: does the normal function of APP explain the topography of neurodegeneration?" *Neurochem Res* 23(5): 795-806.

Small, D. H. and R. Cappai (2006). "Alois Alzheimer and Alzheimer's disease: a centennial perspective." *J Neurochem* 99(3): 708-10.

Stegers-Theunissen, R. P., G. H. Boers, et al. (1995). "Neural tube defects and elevated homocysteine levels in amniotic fluid." *Am J Obstet Gynecol* 172(5): 1436-41.

Stein, J. H. and P. E. McBride (1998). "Hyperhomocysteinemia and atherosclerotic vascular disease: pathophysiology, screening, and treatment. off." *Arch Intern Med* 158(12): 1301-6.

Streck, E. L., D. Delwing, et al. (2003). "Brain energy metabolism is compromised by the metabolites accumulating in homocystinuria." *Neurochem Int* 43(6): 597-602.

Streck, E. L., C. Matte, et al. (2003). "Impairment of energy metabolism in hippocampus of rats subjected to chemically-induced hyperhomocysteinemia." *Biochim Biophys Acta* 1637(3): 187-92.

Strittmatter, W. J., K. H. Weisgraber, et al. (1993). "Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(17): 8098-102.

Struhl, G. and I. Greenwald (1999). "Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*." *Nature* 398(6727): 522-5.

Subramanian, A., P. Tamayo, et al. (2005). "Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(43): 15545-50.

Bibliografía

- Sung, J. J., H. J. Kim, et al. (2002). "Homocysteine induces oxidative cytotoxicity in Cu,Zn-superoxide dismutase mutant motor neuronal cell." *Neuroreport* 13(4): 377-81.
- Terry, R. D. (1994). "Neuropathological changes in Alzheimer disease." *Prog Brain Res* 101: 383-90.
- Teunissen, C. E., J. de Vente, et al. (2002). "Biochemical markers related to Alzheimer's dementia in serum and cerebrospinal fluid." *Neurobiol Aging* 23(4): 485-508.
- Tyagi, N., K. S. Moshal, et al. (2005). "Mitochondrial mechanism of oxidative stress and systemic hypertension in hyperhomocysteinemia." *J Cell Biochem* 96(4): 665-71.
- Tyagi, S. C., D. Lominadze, et al. (2005). "Homocysteine in microvascular endothelial cell barrier permeability." *Cell Biochem Biophys* 43(1): 37-44.
- Upchurch, G. R., Jr., G. N. Welch, et al. (1997). "Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase." *J Biol Chem* 272(27): 17012-7.
- Upchurch, G. R., Jr., G. N. Welch, et al. (1997). "Stimulation of endothelial nitric oxide production by homocyst(e)ine." *Atherosclerosis* 132(2): 177-85.
- Vafai, S. B. and J. B. Stock (2002). "Protein phosphatase 2A methylation: a link between elevated plasma homocysteine and Alzheimer's Disease." *FEBS Lett* 518(1-3): 1-4.
- Vetrivel, K. S., Y. W. Zhang, et al. (2006). "Pathological and physiological functions of presenilins." *Mol Neurodegener* 1: 4.
- Vicente, M. C. (2007). Convergencia de estrés de retículo endoplásmico y estrés oxidativo como modelo celular de neurodegeneración. 170 pags..
- Vitvitsky, V., M. Thomas, et al. (2006). "A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis." *J Biol Chem* 281(47): 35785-93.
- Wakutani, Y., H. Kowa, et al. (2004). "The regulatory region polymorphisms of the MTHFR gene are not associated with Alzheimer's disease." *Dement Geriatr Cogn Disord* 17(3): 147-50.

- Wakutani, Y., H. Kowa, et al. (2004). "A haplotype of the methylenetetrahydrofolate reductase gene is protective against late-onset Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 25(3): 291-4.
- Wall, R. T., J. M. Harlan, et al. (1980). "Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury." *Thromb Res* 18(1-2): 113-21.
- Wang, B., F. Jin, et al. (2005). "Association of MTHFR gene polymorphism C677T with susceptibility to late-onset Alzheimer's disease." *J Mol Neurosci* 27(1): 23-7.
- Wang, G., J. Dai, et al. (2005). "Folic acid reverses hyper-responsiveness of LPS-induced chemokine secretion from monocytes in patients with hyperhomocysteinemia." *Atherosclerosis* 179(2): 395-402.
- Weiss, N., Y. Y. Zhang, et al. (2001). "Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocyst(e)ine-induced endothelial dysfunction." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(22): 12503-8.
- White, A. R., X. Huang, et al. (2001). "Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways." *J Neurochem* 76(5): 1509-20.
- Wilcken, D. E. and V. J. Gupta (1979). "Cysteine-homocysteine mixed disulphide: differing plasma concentrations in normal men and women." *Clin Sci (Lond)* 57(2): 211-5.
- Wolfe, M. S., W. Xia, et al. (1999). "Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity." *Nature* 398(6727): 513-7.
- Yamaguchi, H., T. Yamazaki, et al. (1994). "Localization of Alzheimer amyloid beta protein precursor and its relation to senile plaque amyloid." *Gerontology* 40 Suppl 2: 65-70.
- Yu, H., C. A. Saura, et al. (2001). "APP processing and synaptic plasticity in presenilin-1 conditional knockout mice." *Neuron* 31(5): 713-26.
- Zhang, Y. D., X. Y. Ke, et al. (2005). "Relationship of homocysteine and gene polymorphisms of its related metabolic enzymes with Alzheimer's disease." *Chin Med Sci J* 20(4): 247-51.
- Zhao, W. Q., Z. Williams, et al. (2002). "S-adenosyl-methionine-induced apoptosis in PC12 cells." *J Neurosci Res* 69(4): 519-29.

Bibliografía

Ziemska, E., E. Matyja, et al. (2006). "Excitotoxic neuronal injury in acute homocysteine neurotoxicity: role of calcium and mitochondrial alterations." *Neurochem Int* 48(6-7): 491-7.

Ziemska, E., A. Stafiej, et al. (2003). "Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurones." *Neurochem Int* 43(4-5): 481-92.

